

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I**



**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE NUEVAS
ALTERNATIVAS EN EL TRATAMIENTO DE
“STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Teresa López Casla

Bajo la dirección de la doctora
Maria Luisa Gómez-Lus Centelles

Madrid, 2009

• **ISBN: 978-84-692-1020-8**

©María Teresa López Casla, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I



ESTUDIO MICROBIOLÓGICO
DE NUEVAS ALTERNATIVAS
EN EL TRATAMIENTO DE
Stenotrophomonas maltophilia

TESIS DOCTORAL

MARIA TERESA LÓPEZ CASLA
Madrid, 2008

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo:

Al Profesor D. José Prieto Prieto, por la confianza depositada en mi, brindándome la oportunidad de formarme como investigadora.

A la Profesora D^a Maria Luisa Gómez-Lus Centelles, por su continuo estímulo y ayuda, por su dedicación en la preparación y revisión de este trabajo y por las largas e interesantes conversaciones mantenidas.

A mis compañeros de laboratorio, David y Luís (gracias por darme el "Do"), Almudena ("you can, you can..."), Beatriz, Carmen R., Eva, Fabio, Maite-cucha, Martha, Natalia, Olatz, Raquel y Rebeca, por las muchas horas compartidas.

Por último, a aquellos que, de otra forma, han contribuido a que esta Tesis Doctoral "llegara a buen puerto": a mi familia (Pepo y Margui, Pati, Cris, Josete, tíos, primos, abuelos, mascotas...ha sido largo ¿eh?), a mis amigas de siempre (Blanca, Amparo, Ana, Laura; ¿cuántos años van ya? 15-20...), a "los chicos" (Fran, Miguel, Raúl), a mis "biolocos" (esa "peaaaaso" de Martuqui, Alberto, Chuchi, Rut y Jesús, María y Javi, Jaime y Ana, Ramón y Patricia, Montse, Víctor), a mis "castores" (Iván, Dani, Mari, Ana, Daniela, Rodri, Marian, tita Nati, Cris), a todos y cada uno de vosotros, y también a los que pueda olvidar, GRACIAS por haber confiado más en mí que yo misma.

"...Para luchar siempre hay motivos..."

Indras

A mis padres

A mis hermanos

A "mi" Didu, esto es por y para ti...

D^a MARÍA LUISA GÓMEZ-LUS CENTELLES, Profesora titular del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación, titulado: ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE NUEVAS ALTERNATIVAS EN EL TRATAMIENTO DE *Stenotrophomonas maltophilia*, constituye la memoria presentada por María Teresa López Casla para aspirar al grado de Doctora por esta Universidad, y ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid, 05 de mayo de 2008.

Fdo. Profa. Dra. M^a Luisa Gómez-Lus Centelles

ÍNDICE

ABREVIATURAS

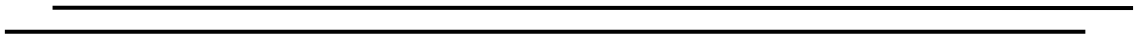
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Características microbiológicas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1
1.1.1. Evolución taxonómica.....	1
1.1.2. Identificación bioquímica. Características morfológicas y de crecimiento.....	2
1.1.3. Factores de virulencia.....	3
1.2. Interacción con el medio.....	4
1.3. Importancia clínica.....	6
1.3.1. Factores de riesgo.....	6
1.3.2. Infecciones del tracto respiratorio.....	8
1.3.3. Bacteriemias.....	9
1.3.4. Endocarditis.....	10
1.3.5. Infecciones de la piel y tejidos blandos.....	11
1.3.6. Infecciones oftalmológicas.....	11
1.3.7. Otras manifestaciones clínicas.....	11
1.4. Mecanismos de resistencia descritos en <i>S. maltophilia</i> frente a los principales grupos de antibióticos.....	12
1.4.1. Alteraciones en membrana externa y sistemas de expulsión activa.....	12
1.4.2. Mecanismos de resistencia asociados a betalactamasas.....	14
1.4.3. Enzimas modificantes de aminoglucósidos.....	16
1.4.4. Enzimas inactivantes de macrólidos.....	16
1.4.5. Resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol).....	16
1.5. Terapia antimicrobiana de las colonizaciones/infecciones producidas por <i>S. maltophilia</i>	17
1.5.1. Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i>	17

1.5.2. Técnicas de tipificación.....	19
1.5.3. Tratamiento de elección.....	21
1.6. Nuevas estrategias terapéuticas: desarrollo de sistemas PK/PD.....	23
1.6.1. Valoración de nuevas moléculas o estrategias terapéuticas.....	24
1.6.2. Definición de algunos términos de interés.....	25
 2. OBJETIVOS.....	 30
 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	 32
3.1. Cepas bacterianas.....	32
3.2. Identificación y tipado de los aislamientos clínicos de <i>S. maltophilia</i>	33
3.2.1. Identificación bioquímica.....	33
3.2.2. Tipificación genotípica.....	33
3.2.3. Análisis de los datos de tipificación.....	35
· 3.2.3.1. Índice de discriminación.....	35
· 3.2.3.2. Relación filogenética.....	35
· 3.2.3.3. Cálculo del peso molecular de los fragmentos de ADN.....	36
3.3. Estudio de sensibilidad a antimicrobianos.....	37
3.3.1. Agentes antimicrobianos.....	37
3.3.2. Test de sensibilidad a antimicrobianos: determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	37
3.3.3. Análisis e interpretación de los resultados	39
3.4. Curvas de muerte bacteriana.....	41
3.4.1. Selección de cepas.....	41
3.4.2. Antimicrobianos testados.....	42

· 3.4.2.1. Combinación betalactámico-inhibidor de betalactamasas.....	42
· 3.4.2.2. Combinación betalactámico-quinolona.....	42
3.4.3. Desarrollo de las curvas de letalidad.....	43
3.4.4. Interpretación de los resultados.....	43
3.5. Sistema farmacodinámico <i>in vitro</i>	45
3.5.1. Selección de cepas.....	45
3.5.2. Antimicrobianos y medios de cultivo.....	45
3.5.3. Sistema farmacodinámico <i>in vitro</i> : composición.....	46
3.5.4. Procedimiento experimental.....	47
3.5.5. Dosis simuladas.....	50
3.5.6. Farmacocinética.....	51
· 3.5.6.1. Farmacocinética teórica y práctica.....	51
· 3.5.6.2. Determinación de los niveles de antimicrobiano simulado: bioensayo.....	53
3.5.7. Farmacodinamia: curvas de muerte bacteriana.....	54
3.5.8. Análisis de los datos.....	55
· 3.5.8.1. Análisis de los datos farmacocinéticos.....	55
· 3.5.8.2. Valoración del efecto antibacteriano.....	55
3.5.9. Comprobación del posible desarrollo/selección de resistencias tras la administración del tratamiento antibiótico.....	56
· 3.5.9.1. Sensibilidad post-tratamiento.....	56
· 3.5.9.2. Análisis del perfil poblacional.....	56
 4. RESULTADOS.....	 58
4.1. Análisis de la diversidad genética mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE).....	58
4.2. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos.....	70

4.2.1. Perfil de sensibilidad a aminoglucósidos.....	76
4.2.2. Perfil de sensibilidad a betalactámicos.....	76
· 4.2.2.1. Sinergismo.....	78
4.2.3. Perfil de sensibilidad a quinolonas.....	79
4.2.4. Perfil de sensibilidad a macrólidos.....	80
4.2.5. Perfil de sensibilidad a tetraciclinas.....	80
4.2.6. Perfil de sensibilidad a otros antimicrobianos.....	81
4.2.7. Variación en el perfil de sensibilidad de <i>S. maltophilia</i> considerando aislamientos únicos frente a aislamientos repetidos.....	81
4.3. Estudio de sinergismo “in vitro”: curvas de muerte bacteriana.....	82
4.3.1. Betalactámicos-inhibidor de betalactamasas.....	83
4.3.2. Betalactámicos-quinolonas.....	93
4.3.3. Betalactámico-inhibidor de betalactamasas frente a betalactámicos-quinolonas...97	
4.4. Sistema farmacodinámico “in vitro”.....	99
4.4.1. Farmacocinética.....	101
4.4.2. Farmacodinamia: actividad antibacteriana comparativa.....	103
4.4.3. Comprobación del posible desarrollo/selección resistencias tras la administración del tratamiento antibiótico.....	108
· 4.4.3.1. Sensibilidad post-tratamiento.....	108
· 4.4.3.2. Análisis del perfil poblacional.....	108
5. DISCUSIÓN.....	113
6. CONCLUSIONES.....	143
7. BIBLIOGRAFÍA.....	145

ABREVIATURAS



ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
C	Citosina
CI	Aclaramiento
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C_{máx}	Concentración máxima
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMI₅₀	CMI para el 50% de la población
CMI₉₀	CMI para el 90% de la población
C_{ss}	C _{máx} media en el estadio estacionario para una IC
C_{últ}	Última concentración de fármaco detectada
G	Guanina
IC	Infusión continua
ITU	Infección del Tracto Urinario
IV	Intravenoso
Kb	Kilobase
L	Litro
Log	Logaritmo decimal
MENSURA	Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos
mg	Miligramo
ml	Mililitro
NCCLS	National Comité for Clinical Laboratory Standard

nm	Nanómetro
PAP	Análisis del Perfil Poblacional
Pb	Par de bases
PBP	Proteína de unión a penicilina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Electroforesis en Campo Pulsante
pI	Punto isoeléctrico
QRDR	Región Determinante de Resistencia a Quinolonas
Sma	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
T_{1/2}	Vida media
T_{máx}	Tiempo al que se alcanza la C _{máx}
T_{últ}	Último tiempo en que se detecta concentración de fármaco
U	Unidad
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
V	Voltios
V_d	Volumen de distribución
λ	Lambda
μg	Microgramos
μl	Microlitros

INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *Stenotrophomonas maltophilia*

· 1.1.1. Evolución taxonómica

La posición taxonómica de *Stenotrophomonas maltophilia* ha estado envuelta en un debate que ha durado varios años hasta que en 1993 Palleroni y Bradbury ⁽¹⁾ propusieron la creación de un nuevo género denominado *Stenotrophomonas* (*Stenos*, del griego estrecho; *trophos*, del griego alimento; *monas*, del griego única o unidad, pocos sustratos para alimentarse; *malt*, del inglés maltosa; *philia*, del griego amistad), que se considera la designación actualmente aceptada.

La cepa tipo (ATCC 13637) fue aislada en 1958 por Hugh a partir de un paciente con carcinoma oral. Sin embargo, su primera descripción taxonómica no fue hasta 1961, cuando Hugh y Ryschenkow procedieron a denominarla *Pseudomonas maltophilia* ⁽²⁾. Posteriormente, mediante técnicas de hibridación DNA-rRNA fue posible estudiar la homología en los cistrones de rRNA entre la cepa ATCC 13637 y cepas del género *Xanthomonas*. La mayor similitud de diversos fragmentos del rRNA de la cepa tipo con especies del género *Xanthomonas* fue empleada por Swings y cols. en 1983 ⁽³⁾ para transferir este microorganismo al género *Xanthomonas*. La nueva ubicación taxonómica fue apoyada por la ausencia de NADP-deshidrogenasas, el contenido en guanina-citosina (en proporción muy similar a *Xanthomonas*), el mismo tipo de ubiquinonas y una composición en ácidos grasos y proteínas celulares muy semejantes.

La propuesta en 1993 de un nuevo género, como consecuencia de la disconformidad con la clasificación de este microorganismo, fue posteriormente apoyada en base a las diferencias existentes en el mapa de restricción de los genes rRNA 16s entre *Xanthomonas* y *Stenotrophomonas* ⁽⁴⁾.

Finalmente, en 1997 *S. maltophilia* dejó de ser miembro único del género *Stenotrophomonas* al incluirse en el mismo una nueva e infrecuente especie denominada *S. africana* que presentaba características bioquímicas idénticas a *S. maltophilia*, excepto por su incapacidad para hidrolizar el *cis*-aconitato ⁽⁵⁾. Sin embargo, un reciente estudio publicado por Coenye y cols. ⁽⁶⁾ demuestra que la especie definida como *S. africana* no es sino un sinónimo de la ya denominada *S. maltophilia*.

En los últimos años se han estudiado aislamientos medioambientales que, por sus características fenotípicas y genotípicas, han sido incluidas en el género *Stenotrophomonas* como nuevas especies: *Stenotrophomonas nitritireducens* ⁽⁷⁾, *Stenotrophomonas acidaminiphila* ⁽⁸⁾, *Stenotrophomonas rhizophila* ⁽⁹⁾ y *Stenotrophomonas dokdonensis* ⁽¹⁰⁾. A día de hoy, no consta en la bibliografía existente que estas especies posean relevancia clínica.

· 1.1.2. Identificación bioquímica. Características morfológicas y de crecimiento.

Stenotrophomonas maltophilia es un bacilo gramnegativo, recto o ligeramente curvado, no formador de esporas, que presenta un tamaño aproximado de 0,4-0,7 µm de ancho por 0,7-1,8 µm de largo. Considerada como bacteria móvil, debe su movilidad a la presencia de varios flagelos polares. Aparecen como bacilos individuales o en parejas, no acumulando gránulos de poli-β-hidroxi-butarato en su interior. Macroscópicamente, en agar sangre se presenta en forma de colonias lisas, brillantes, bien delimitadas y de color blanco a amarillo pálido, con olor a amoníaco; aunque no está considerado como microorganismo β-hemolítico, puede producir una coloración grisácea-verdosa en las zonas de confluencia de crecimiento ⁽⁴⁾.

S. maltophilia es un aerobio obligado cuya temperatura de crecimiento oscila entre 5° C y 40° C, siendo la temperatura óptima de 35° C; gran parte de las cepas de este microorganismo, que no todas, requieren metionina o cisteína para su crecimiento ⁽⁴⁾.

Bioquímicamente se caracteriza por producir una reacción negativa en la prueba de la oxidasa, oxidación de la glucosa y especialmente de la maltosa, y una producción extracelular de enzima DNAasa que puede tardar en detectarse entre 48 y 72 horas. Entre las pruebas bioquímicas positivas (más del 85% de los casos) destacan: síntesis de ornitina descarboxilasa, hidrólisis de la esculina, de la gelatina y del Tween 80. Pese a no ser muy activa metabólicamente, *S. maltophilia* puede metabolizar algunos sustratos inusuales como la estreptomicina ⁽¹¹⁾, por lo que ha sido investigada como potencial agente biodegradante ^(12, 13).

· 1.1.3. Factores de virulencia

A la hora de abordar un proceso infeccioso cualquiera, se debe considerar que tanto el origen como el desarrollo del mismo dependen directamente de la interrelación de varios factores: la propia capacidad infectiva del microorganismo, factores ambientales y factores inherentes al propio huésped objeto de la infección.

Los factores de virulencia de *S. maltophilia* aún no son bien conocidos. La dificultad para diferenciar entre colonización e infección ha llevado a creer que este microorganismo tiene una limitada patogenicidad. Esta afirmación está reforzada por el hecho de que el aislamiento de *S. maltophilia* no esté relacionado con una necesaria evolución negativa del estado clínico del paciente ^(4, 14), sugiriéndose su intervención en una infección clínica si actúa en sinergia con otros microorganismos ⁽¹⁵⁾. Aunque la toxicidad de los extractos bacterianos de *S. maltophilia* es menor que la producida por *E. coli*, tal y como avalan estudios experimentales en modelos animales que apoyan la hipótesis de que *S. maltophilia* no causa sepsis severa cuando se administra en ratones por vía intravenosa ⁽⁴⁾, se han realizado diferentes trabajos en los que se verifica la producción por parte de este patógeno de diferentes enzimas extracelulares: ADNasa, ARNasa, fibrolisina, lipasa, hialuronidasa, proteasas y elastasas, que intervendrían en las infecciones asociadas a este microorganismo ⁽¹⁶⁾.

S. maltophilia posee una carga superficial positiva a pH fisiológicos, lo cual favorece su adherencia a materiales con carga negativa como el teflón y el vidrio. De la misma forma, es capaz de adherirse a distintos tipos de plásticos y, por tanto, a cánulas intravasculares y tubos endotraqueales, facilitando procesos de infección/colonización asociados a técnicas de cateterismo, intubación y traqueotomía ^(17, 18). Esta sería, por tanto, una importante propiedad de la bacteria, generalmente implicada en la transmisión de colonizaciones o infecciones epidemiológicamente relacionadas, puesto que el material empleado en las técnicas invasivas anteriormente referidas ha sido descrito como una importante fuente de transmisión nosocomial tanto en cepas de origen clínico como en cepas de origen ambiental ^(4,14, 19).

La ávida adhesión a los implantes médicos y catéteres se debe a la formación de una biopelícula que supone una protección natural frente a las defensas del sistema inmune y los diferentes agentes antimicrobianos ⁽²⁰⁾. Englobado en el estudio de la adhesión de *Stenotrophomonas maltophilia* a las células epiteliales y de la naturaleza de los factores de la superficie bacteriana que determinan la formación de la biopelícula sobre superficies inertes, De Oliveira-García y col. ⁽²¹⁾ han publicado un estudio en el que identifican y caracterizan las estructuras – fimbrias- producidas durante el crecimiento de *S. maltophilia* a 37°C. Mediante microscopía electrónica de alta resolución, han comprobado cómo esas fimbrias actúan como puentes entre la bacteria y las superficies a las que se adhiere (inerte o célula epitelial); participando, por tanto, en hemaglutinación, formación de biopelículas y adherencia a cultivos de células de mamífero.

1.2. INTERACCIÓN CON EL MEDIO

Stenotrophomonas maltophilia ha cobrado gran importancia clínica en los últimos años al emerger como patógeno nosocomial asociado a pacientes inmunocomprometidos, junto a otros

bacilos gramnegativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*^(4, 15,22).

El aumento de una población que presenta los factores de riesgo, pacientes con quimioterapia intensiva por neoplasias o con la inmunodepresión necesaria para la prevención de rechazo de los órganos transplantados, hace a éstos ser susceptibles a una infección por *S. maltophilia*. Este hecho, así como la utilización de dispositivos de acceso intravascular y una mayor disposición de antimicrobianos de amplio espectro que le aportaría ventajas ecológicas por su carácter multirresistente, explicarían el incremento producido en el aislamiento de este patógeno.

En cuanto a su hábitat, *Stenotrophomonas maltophilia* es un organismo de localización ubicua capaz de colonizar diferentes nichos ecológicos; ha sido aislado en agua (agua embotellada, aguas residuales, lagos hipereutróficos, pozos y ríos), en suelo, en la rizosfera de diferentes vegetales (algodón, cítricos, maíz, trigo, etc), en animales (animales de laboratorio, conejos, ovejas, peces, ranas y serpientes) y en alimentos (cerdos, huevos, leche y pescados congelados).

En el medio hospitalario se aísla en el agua procedente de respiraderos, grifos y sumideros, en desinfectantes, jabones, descontaminantes preoperatorios, tubos con EDTA, reservorios de humidificadores de oxigenoterapia, catéteres de succión traqueal y bombas auxiliares cardiopulmonares, y en ocasiones en las manos del personal sanitario ^(4, 14, 23).

La adquisición de este microorganismo está asociada principalmente al ámbito hospitalario, aunque existen pocos estudios donde se demuestre su transmisión nosocomial, incluso en el caso de brotes. De esta forma, la información referente a las relaciones genómicas dentro de esta especie, así como el grado de relación existente entre cepas nosocomiales, es escasa ^(24, 25).

La vía de entrada de *Stenotrophomonas maltophilia* frecuentemente es desconocida, la hospitalización prolongada y la antibioterapia de amplio espectro podría seleccionar este organismo a partir de la localización respiratoria o gastrointestinal de cada paciente o a partir de fuentes ambientales, lo cual explicaría su elevada diversidad genómica (4, 25, 26).

1.3. IMPORTANCIA CLÍNICA

Stenotrophomonas maltophilia puede producir un amplio espectro de procesos infecciosos. A pesar de que se le ha considerado fundamentalmente un patógeno nosocomial (27-29), produce también infecciones en la comunidad, y con una frecuencia superior a la estimada anteriormente: entre 22% y un 50% de los aislamientos son de adquisición extra-hospitalaria(4,28).

Aislado de cualquier localización en pacientes hospitalizados, se encuentra principalmente como organismo contaminante sin acompañarse de clínica. La baja patogenicidad asociada a este microorganismo puede deberse a la dificultad para diferenciar entre colonización e infección, principalmente cuando *S. maltophilia* se aísla en lugares superficiales y habitualmente no estériles, como la piel y el tracto respiratorio alto (4, 14). Este problema a la hora de diferenciar entre colonización e infección está potenciado por la carencia de un conocimiento profundo de los factores de virulencia de *S. maltophilia* anteriormente referida.

Puede estar implicado en numerosos procesos infecciosos, pero los más frecuentes son los de las vías respiratorias (4, 19, 22, 24, 29).

· 1.3.1. Factores de riesgo

Los pacientes con infección por este microorganismo presentan factores de riesgo intrínseco, como la inmunodepresión de diferente naturaleza y enfermedades previas subyacentes: EPOC, cardiovasculares, hepatobiliar, trasplante, diálisis, VIH, diabetes mellitus,

drogadicción, tabaquismo, alcoholismo ⁽²⁷⁾. Un factor a destacar asociado a la adquisición de este patógeno es la presencia de neoplasias, principalmente leucemias agudas y carcinoma de mama.

Por otro lado, como factores de riesgo extrínsecos se han descrito la presencia de catéteres vasculares, ventilación asistida o traqueotomía, técnicas diagnósticas invasoras, hospitalización prolongada o estancia en UCI, uso de equipamiento en contacto con el tracto respiratorio (nebulizadores, por ejemplo), quimioterapia citotóxica, corticosteroides y la exposición previa a antibioticoterapia de amplio espectro ^(14, 19, 20, 29).

Es difícil atribuir de forma directa la elevada mortalidad a la infección por *S. maltophilia* propiamente dicha, puesto que las enfermedades de base de los pacientes contribuyen en la mayoría de los casos a aumentar esta tasa. Factores principales asociados a la mortalidad son la neumonía crónica y la ventilación asistida en UCI, una edad superior a 40 años y el aislamiento del microorganismo a nivel pulmonar, siendo uno de los mejores predictores de la mortalidad la neumonía postventilación ⁽²⁷⁾.

Los pacientes con fibrosis quística son otro grupo de enfermos en los que la prevalencia de *Stenotrophomonas maltophilia* se ha incrementado, tanto cuantitativa como cualitativamente, en las últimas décadas, con una gran variabilidad dependiendo del centro hospitalario ⁽²³⁾. En esta enfermedad se produce un transporte iónico deficiente en la superficie apical de las células epiteliales de los aparatos respiratorio, gastrointestinal y reproductivo, y en los conductos hepatobiliares, pancreáticos y sudoríparos; la reabsorción del cloro y el sodio, y por consiguiente del agua, se traduce en un aumento de la viscosidad de las secreciones. Son estas secreciones las que proporcionan un nicho ecológico perfecto para la colonización crónica de determinados patógenos.

El hecho de tratarse de pacientes sometidos a antibioterapia de amplio espectro, con varios regímenes anuales de antibióticos, con hospitalizaciones frecuentes y, adicionalmente, las

infecciones pulmonares previas y la enfermedad crónica respiratoria, supone un incremento del nivel de resistencia de microorganismos “instalados” y la aparición de microorganismos con una multirresistencia intrínseca, como es el caso de *S. maltophilia*.

· 1.3.2. Infecciones del tracto respiratorio

El tracto respiratorio ha sido descrito como el punto más habitual de aislamiento e infección/colonización por parte de *S. maltophilia* ^(19, 22), de forma que entre el 56% y el 69% de los aislamientos de dicho microorganismo proceden de esta localización ⁽⁴⁾ y con frecuencia la fuente de adquisición es desconocida.

El desarrollo de neumonías suele darse en pacientes con ventilación mecánica, traqueotomía, o con equipos de respiración como nebulizadores y con tratamiento de polimixina oral o antibióticos de amplio espectro ^(4, 14, 30). En la mayoría de los pacientes existe deterioro pulmonar previo como consecuencia de bronquiestasias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), obstrucción endobronquial e, incluso, trasplante pulmonar ^(4, 27).

S. maltophilia es reconocido como agente etiológico del 5% de las neumonías nosocomiales diagnosticadas, y destaca por estar asociado a un incremento significativo de la mortalidad de los pacientes afectados por esta patología ^(27, 31). Khardori y cols. ⁽³⁰⁾, por ejemplo, describen en una serie de infecciones nosocomiales por este microorganismo en pacientes con cáncer a 5 pacientes con neumonías, de los que 3 finalmente fallecieron. Por otra parte, la asociación de este microorganismo con infecciones del tracto respiratorio superior es escasa ⁽⁴⁾.

S. maltophilia fue descrito por primera vez en el tracto respiratorio de un paciente con fibrosis quística por Frederiksen en Dinamarca en 1975, apareciendo en la actualidad como el cuarto organismo por orden de prevalencia aislado en las secreciones bronquiales de los pacientes de fibrosis quística tras *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *H. influenzae* ^(4, 32, 33).

El significado pronóstico de *S. maltophilia* en la función pulmonar de los pacientes con fibrosis quística es incierto. Pese a que existen estudios ^(34, 35, 36) en los que no se ha encontrado relación entre una evolución negativa de la función pulmonar y la adquisición de *S. maltophilia*, algunos autores refieren un progresivo deterioro de dicha función, particularmente en aquellos pacientes colonizados crónicamente durante largos periodos de tiempo y con recuentos de *S. maltophilia* en esputo superiores a $10^5 - 10^6$ UFC/ml ^(4, 37). Lo que si parece claro es que en pacientes con cultivo positivo para *S. maltophilia* la tasa de mortalidad es mayor y la función pulmonar está degradada respecto a aquellos pacientes con cultivo negativo, de forma que la presencia de este microorganismo contribuiría a un deterioro clínico más rápido cuando la función pulmonar está disminuida, agravando la situación clínica del paciente a corto, medio o largo plazo ⁽²³⁾.

· 1.3.3. Bacteriemias

La bacteriemia es una de las manifestaciones habituales de la infección por este microorganismo ^(19, 24). El aislamiento de *S. maltophilia* en hemocultivos presenta una tendencia ascendente en los últimos años. Asociadas al uso de dispositivos intravasculares, suelen tratarse de bacteriemias primarias aunque también pueden presentarse como secundarias a infecciones cardiopulmonares, urinarias, gastrointestinales o de piel y tejidos blandos ^(4, 38, 39), generalmente en aquellos casos donde la fuente de la infección no está clara.

Las recaídas producidas en bacteriemias por *S. maltophilia* son un hecho descrito en la bibliografía. A este respecto, el uso de técnicas moleculares ha permitido demostrar que los aislados de pacientes con al menos tres episodios de bacteriemia en su historial son indistinguibles ^(4, 39).

El ratio de morbilidad/mortalidad asociado a bacteriemias producidas por *S. maltophilia* puede ser alto, encontrándose en la bibliografía tasas de mortalidad entre 12.5 y 69% ^(19, 40).

Algunos autores han citado la frecuencia de bacteriemias polimicrobianas con *S. maltophilia*; Jang y cols. ⁽⁴¹⁾, por ejemplo, han realizado un estudio en el cual el 44% de los 32 casos analizados tuvieron un origen polimicrobiano. De acuerdo con algunos investigadores, el ratio de mortalidad asociado a estas bacteriemias polimicrobianas no sería significativamente diferente al grado asociado a las bacteriemias producidas únicamente por *S. maltophilia*, aunque esto contrasta con otros informes publicados ⁽⁴⁾. Por otra parte, sí hay consenso al afirmar que la mortalidad asociada a bacteriemias por *S. maltophilia* es equivalente a la tasa atribuible a otros patógenos nosocomiales ⁽⁴⁰⁾.

La septicemia producida por *S. maltophilia* puede verse complicada por la coagulación intravascular diseminada, la púrpura fulminante y manifestaciones cutáneas, como el ectima gangrenoso.

Es importante distinguir entre bacteriemia real producida por *S. maltophilia* de pseudobacteriemia, surgida como consecuencia del uso de frascos de hemocultivo contaminados o de tubos de coagulación no estériles. Se cree que este tipo de episodios son más frecuentes de lo que generalmente se reconoce ⁽⁴⁾; recientemente Siebor E y cols ⁽⁴²⁾ han publicado un estudio en el que identifican un dispensador de desinfectante como origen de un brote de pseudobacteriemia.

· 1.3.4. Endocarditis

Puede presentarse sobre válvula protésica de forma tardía o sobre válvula sana de individuos que han abusado de drogas por vía parenteral, también se han datado casos debidos a cirugía cardíaca previa con dispositivos vasculares contaminados. La forma de presentación clínica es similar a la de otros bacilos gramnegativos y su pronóstico es variable, produciéndose un índice de mortalidad del 39%, similar para las endocarditis protésicas y para las nativas ⁽³⁹⁾. En estos casos son necesarias la sustitución de la válvula infectada y la antibioterapia.

Otras manifestaciones cardiacas de *S. maltophilia* descritas en la literatura son pericarditis, infección del saco pseudopericárdico en un corazón artificial y bacteriemia asociada a prolapso de la válvula mitral ⁽⁴⁾.

· 1.3.5. Infecciones de la piel y tejidos blandos

El papel de *S. maltophilia* como patógeno es difícil de discernir especialmente cuando es aislado en lesiones cutáneas o de tejidos blandos. La detección del microorganismo no se puede relacionar directamente con la presencia de infección al poder actuar como colonizador, principalmente si son cultivos polimicrobianos ⁽⁴³⁾.

Las manifestaciones clínicas descritas incluyen celulitis primaria, lesiones epiteliales o celulitis metastática nodular, celulitis gangrenosa, necrosis de tejidos blandos, ectima gangrenoso e infección de úlceras mucocutáneas ^(4, 16).

· 1.3.6. Infecciones oftalmológicas

Ya en 1997 Penland y Wilhelmus comunicaron ⁽⁴⁴⁾ un aumento en la incidencia de infecciones oculares por *S. maltophilia*. Entre las patologías descritas están la conjuntivitis, queratitis, celulitis preseptal, dacriocistitis, endoftalmitis y úlceras corneales. Esta bacteria también ha estado implicada en casos de contaminación de lentes de contacto y de sus sistemas de cuidado. Puede presentarse de forma conjunta con *Acanthamoeba spp.* ocasionando queratitis en usuarios de lentes de contacto ⁽⁴⁵⁾.

· 1.3.7. Otras manifestaciones clínicas

El aislamiento de *S. maltophilia* se realiza con relativa frecuencia en muestras de orina, aunque no está considerada una causa frecuente de infección del tracto urinario. Los casos

descritos tienen generalmente un origen nosocomial y son secundarios a instrumentalización del tracto genitourinario, cirugía o enfermedades estructurales del mismo ^(4, 19).

Con menor frecuencia se han descrito casos de infección intraabdominal y del tracto gastrointestinal, aunque este patógeno es considerado como una causa muy rara de infección. Aunque muy escasamente, también se ha asociado *S. maltophilia* a meningitis e infecciones de huesos y articulaciones ⁽⁴⁾.

1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA DESCRITOS EN *Stenotrophomonas maltophilia* FRENTE A LOS PRINCIPALES GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS

En la resistencia múltiple de *S. maltophilia* participan diversos factores, como son la permeabilidad disminuida que impide la entrada de los antimicrobianos, la falta de un sistema de transporte para ese antibiótico, la existencia de sistemas de expulsión activa de antimicrobianos y la producción de enzimas hidrolíticas o inactivantes. Como en otros gramnegativos no fermentadores ⁽⁴⁶⁾, el fenotipo multirresistente (MDR) se debe a fenómenos de corresponsencia (presencia de diferentes mecanismos de resistencia que confieren a la bacteria una sensibilidad reducida frente a un determinado grupo de antibióticos) y de resistencia cruzada (un único mecanismo bioquímico es el responsable de la resistencia de la bacteria frente a la mayoría de los miembros de una clase de antimicrobianos).

· 1.4.1. Alteraciones en membrana externa y sistemas de expulsión activa

La permeabilidad disminuida de *S. maltophilia* ha sido considerada durante mucho tiempo como factor responsable de su fenotipo multirresistente (MDR). Los trabajos desarrollados en las dos últimas décadas han permitido descubrir que la MDR asociada a membrana externa se explica no sólo por alteraciones en la composición de la membrana, sino

también por una mayor expresión de las proteínas de membrana externa implicadas en los mecanismos de expulsión activa ⁽²³⁾.

El mecanismo prioritario de resistencia a aminoglucósidos es una baja permeabilidad, de manera que diferencias en la captación de los diferentes aminoglucósidos, debido a cambios en la membrana externa, explicarían la variabilidad en la sensibilidad frente a estos antimicrobianos. A este respecto, Rahmati y cols ⁽⁴⁷⁾ han observado que la sensibilidad a los aminoglucósidos dependiente de temperatura se correlaciona con el contenido de fosfatos en los polisacáridos de la membrana (la sensibilidad a 37° C es mayor que a 30° C), y que el mayor punto de interacción iónica de este grupo de antimicrobianos en *S. maltophilia* es el fosfato de los polisacáridos.

La actuación de sistemas de bombas de expulsión activa es un factor que contribuiría, de forma cuantitativamente significativa, al fenotipo de resistencia múltiple intrínseca o adquirida en *S. maltophilia* ^(48, 49). Estos sistemas de eflujo se componen de tres proteínas localizadas en la membrana externa, el espacio periplásmico y la membrana interna de microorganismos gramnegativos, formando un canal capaz de eliminar hacia el exterior de la bacteria un gran número de sustancias mediante un mecanismo de transporte dependiente de protones. Estos sistemas activos detoxificantes, que se denominan SmeM (*Stenotrophomonas* multidrug efflux), presentarían en *S. maltophilia* un comportamiento análogo a los descritos en *P. aeruginosa*, aumentando su expresión como consecuencia de mutaciones en los genes reguladores.

Según el tipo de agente inductor utilizado para la selección de mutantes *in vitro* y el grado de expresión de los diferentes sistemas de expulsión descritos en *S. maltophilia*, la resistencia a betalactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol y quinolonas se incrementa en diferentes niveles (resistencias cruzadas). Así, en mutantes defectivos para betalactamasas de *S. maltophilia*, continúa existiendo, aunque en menor nivel,

resistencia a algunos betalactámicos. Esto indicaría que el sistema SmeABC, equivalente al MexAB-OprM descrito en *P. aeruginosa*, contribuiría en la resistencia a estos agentes ⁽⁵⁰⁾.

Los sistemas de expulsión implicados en multirresistencia a antibióticos que se han descrito en *S. maltophilia* son SmeDEF ⁽⁵¹⁾ y SmeABC ⁽⁵⁰⁾. El sistema SmeDEF contribuye a la resistencia intrínseca a quinolonas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol y novobiocina, así como a compuestos tóxicos no antibióticos (detergentes, solventes orgánicos y colorantes); por otro lado, ni los betalactámicos ni los aminoglucósidos parecen ser buenos sustratos para este sistema ^(51, 52).

El sistema SmeABC no parece estar implicado en la resistencia intrínseca de este microorganismo puesto que, a diferencia de SmeDEF, no se expresa en cepas silvestres ⁽⁵²⁾. Por otra parte, la sobreexpresión de SmeC puede determinar un fenotipo MDR a aminoglucósidos, quinolonas y betalactámicos. Sin embargo, la resistencia a betalactámicos en estos mutantes parece deberse a una sobreexpresión concomitante de betalactamasas, y no a un aumento en el transporte de antibiótico ^(50, 51).

· 1.4.2. Mecanismos de resistencia asociados a betalactamasas

El fenotipo MDR a betalactámicos, fundamentalmente de carácter intrínseco, se debe principalmente a la producción heterogénea de dos tipos de betalactamasas inducibles, L1 y L2^(4, 23, 53-55). Puesto que la expresión de betalactamasas es intrínseca e inducible, se pensó que, al igual que sucede en otras especies bacterianas, la codificación de L1 y L2 es exclusivamente de tipo cromosómico. Sin embargo, el estudio realizado por Avison y cols. ⁽⁵⁵⁾ demuestra que la codificación de estas enzimas se localiza en un fragmento de tipo plasmídico de gran tamaño que puede considerarse como parte de un cromosoma fragmentado.

La L1 es una metaloenzima de amplio espectro, de tercera clase Zn²⁺-dependiente, capaz de hidrolizar a todos los betalactámicos, incluidas penicilinas, cefalosporinas y

carbapenemas, excepto monobactamas. Es sensible a la acción de agentes quelantes como el EDTA, pero no a la acción de inhibidores de betalactamasas. El gen codificante posee un contenido en G+C del 68,4%, con un peso molecular aproximado para la proteína de 29 kDa y un pI de 6,5.

La L2 es una cefalosporinasa de clase A que presenta serina en su centro activo, con una resistencia de alto grado a penicilinas y cefalosporinas, no hidrolizando a penas (0,004% respecto a la cefaloridina) a los carbapenemas. Sensible a la acción de inhibidores de betalactamasas, especialmente a la del ácido clavulánico y del BRL42715 (10 μ M), resiste la acción del EDTA (100 μ M). L2 está constituida por una proteína con un peso molecular aproximado de 31,5 kDa, presenta un pI de 8,4 y el contenido en G+C del gen codificante es de 71,6%. Debido a su gran capacidad para hidrolizar la cefotaxima, fue clasificada en el grupo funcional 2be.

Existe una gran heterogeneidad genética en la producción de betalactamasas. Los diversos valores de pI entre las betalactamasas L1 y L2 de las diferentes cepas se traducen en variaciones en las secuencias de aminoácidos de estas enzimas, aunque por el momento existe poca información sobre la asociación de determinados valores de pI y la presencia de cambios en las secuencias ⁽²³⁾. Esta diversidad en la producción de L1, presente en una misma especie, es un hecho excepcional, diferenciándose actualmente cinco isoformas enzimáticas activas codificadas como L1a ⁽⁵⁶⁾, L1b ⁽⁵⁷⁾, L1c, L1d y L1e ⁽⁵⁵⁾, con unos valores de divergencia en la secuencia de aminoácidos del 21%, 11%, 8% y 19% respecto a la primera descrita, L1a.

La variación alélica también se pone de manifiesto en la betalactamasa L2, diferenciándose cuatro alelos: L2a, L2b, L2c y L2d; éstos presentan unos coeficientes de divergencia de la secuencia proteica del 7%, 5% y 32% respecto a la L2a. Esta variación alélica de los genes codificadores de betalactamasas puede reflejar una evolución acelerada, implicándose procesos de transferencia génica horizontal ⁽²³⁾.

En relación con la regulación de la inducción de estas enzimas, existen estudios que indican que L1 y L2 se inducen por vías distintas, posiblemente divergentes, realizándose el control de la L1 por un regulón de choque térmico adaptado, mientras que el control de la L2 se realizaría por el regulador clásico ampR⁽⁵⁸⁾.

Avison y cols.⁽⁵⁹⁾ han observado la presencia de una betalactamasa TEM-2, con un pl de 5,6 y mediada por el gen bla_{TEM} localizado en un transposón que posee una elevada homología con Tn1 y Tn2, transferible a través de un plásmido conjugativo a una cepa de *E. coli*. Esto sugiere un posible papel de *S. maltophilia* como reservorio para determinantes móviles de resistencia, intercambiando material genético con otras bacterias.

· 1.4.3. Enzimas modificantes de aminoglucósidos

En 1999 Lambert y cols.⁽⁶⁰⁾ publicaron un estudio que confirmaba la presencia de la 6'-N-acetiltransferasa de tipo I en todas las cepas estudiadas (n= 80). La caracterización del gen cromosómico aac(6')-Iz relaciona esta aminoglicosidasa de 16 kDa con la resistencia intrínseca de *S. maltophilia* a la amikacina, netilmicina y tobramicina y, en menor medida, a la gentamicina.

· 1.4.4. Enzimas inactivantes de macrólidos

Este mecanismo de resistencia ha sido descrito por Alonso y cols.⁽⁶¹⁾ como el resultado de la transferencia, a partir de bacterias grampositivas, de un grupo de genes relacionados con la resistencia a antibióticos y a metales pesados. Refieren que uno de estos genes codifica para una enzima, la macrólido 2'-fosfotransferasa II, que presenta una elevada homología en proteínas (99,7%) con respecto a la presente en *S. aureus*.

· 1.4.5. Resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol)

Pese a no haberse realizado aún un estudio minucioso de los mecanismos implicados en la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol), Barbolla y cols.⁽⁶²⁾ han relacionado

la presencia del gen *su1* (integrón de clase 1) con un aumento en la CMI de cotrimoxazol frente a *S. maltophilia*, lo que apoya la hipótesis planteada por este grupo sobre un aumento en la propagación de integrones de clase 1 respecto a otros mecanismos de resistencia, y evidencia posibles limitaciones en el uso de cotrimoxazol como terapia en infecciones severas. Estos datos están avalados por el trabajo recientemente publicado por Toleran y cols. ⁽⁶³⁾, que confirma la relación de estos integrones de clase 1 con un posible desarrollo de resistencia frente a cotrimoxazol en *S. maltophilia*, así como su amplia distribución geográfica.

1.5. TERAPIA ANTIMICROBIANA DE LAS INFECCIONES/COLONIZACIONES PRODUCIDAS POR *Stenotrophomonas maltophilia*

La elección de una pauta antibiótica adecuada para el tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia* puede ser en ocasiones un desafío para clínicos y microbiólogos, debido a los problemas asociados con las pruebas de sensibilidad y a la resistencia intrínseca de la bacteria a la mayoría de los antimicrobianos.

· 1.5.1. Pruebas de sensibilidad *in vitro*.

S. maltophilia se caracteriza por presentar una gran diversidad genómica ^(4, 25, 26) y, sin embargo, posee una gran homogeneidad fenotípica en su perfil de sensibilidad. Su resistencia intrínseca de alto grado le confiere un carácter de multirresistencia que hace que no se vea afectada por la acción de diferentes y numerosos agentes antimicrobianos. Esta resistencia inherente o natural, en combinación con las resistencias adquiridas por presión selectiva de los antimicrobianos, le supone una ventaja ecológica sobre otros posibles patógenos en el medio hospitalario ⁽²³⁾.

El patrón de sensibilidad de *S. maltophilia* a diferentes antimicrobianos ha sido ampliamente publicado por algunos autores, aportando resultados en ocasiones poco concordantes e incluso confusos ^(64, 65). Este hecho implica no poder extraer unas conclusiones definitivas sobre la utilidad de unos u otros resultados, principalmente por las diferencias en los métodos y las condiciones de incubación utilizados, problema muy frecuente con este microorganismo.

La composición del medio de cultivo es un factor determinante para la realización de las pruebas de sensibilidad *in vitro* con *S. maltophilia*; en relación con este hecho, se ha descrito la variación en los resultados de sensibilidad al disminuir los nutrientes del medio de cultivo y cuando se modifica la concentración de Zn^{2+} , lo cual afecta de manera específica a los resultados de sensibilidad a imipenem ⁽²³⁾. Bonfiglio y cols. ⁽⁶⁶⁾ proponen el medio *Isosensitest* como el más adecuado, al aportar menores variaciones en los resultados.

En los últimos 10-15 años, la dependencia de la metodología en la determinación de la sensibilidad de *S. maltophilia* ha sido descrita en diferentes estudios, ofreciendo resultados poco concordantes entre los métodos y las recomendaciones del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) para la realización de las pruebas de sensibilidad *in vitro*. A este respecto, Pankuch y cols. ⁽⁵³⁾ han comparado los resultados de sensibilidad obtenidos por distintos métodos, entre ellos: dilución en agar, microdilución en caldo, *E-test*® y difusión en disco. En este estudio demuestran que la dilución en agar es el método que mejor se correlaciona con los resultados obtenidos en las curvas de muerte bacteriana para ticarcilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam y ciprofloxacino, y que, por tanto, es el más apropiado para la determinación de la CMI en esta especie. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en otros estudios ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

Respecto a los criterios para la identificación de resultados, las discrepancias suscitadas en relación con los diferentes métodos de determinación de sensibilidad han

supuesto la realización de diversos estudios en los que se han incluido nuevos criterios como, por ejemplo, el aumento del diámetro del halo de inhibición de las cepas integradas en la categoría de sensibilidad intermedia a aminoglicósidos, cloranfenicol y algunos betalactámicos ⁽⁷⁰⁾, así como el incremento del tiempo de incubación hasta las 48 horas ^(53, 67), por ejemplo.

La resistencia de diferentes agentes a la temperatura en *S. maltophilia* es otro de los factores que prolongan el debate sin fin a cerca de la validez de las pruebas de sensibilidad con este microorganismo. A lo largo de las dos últimas décadas, numerosos autores, como por ejemplo Rahmati-Bahram y cols. ⁽⁴⁷⁾, han realizado sucesivos estudios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 30° C y los 37° C. Algunos de estos autores proponen que, debido a que en diferentes infecciones causadas por *S. maltophilia*, como “shock” séptico, lesiones en la piel o en la cavidad peritoneal de pacientes sometidos a diálisis, podemos encontrarnos con estas bajas temperaturas, la determinación de la sensibilidad a los aminoglicósidos debería realizarse a 30° C ⁽⁴⁷⁾. Estos hechos ponen de manifiesto las importantes consideraciones clínicas que habrían de tomarse en torno a la resistencia mediada por la temperatura.

· 1.5.2. Técnicas de tipificación.

La recomendación/elección de un tratamiento u otro se basa en la sensibilidad *in vitro* ⁽⁷¹⁾, de forma que la caracterización de los aislamientos, previa determinación de la sensibilidad, podría aportar resultados más precisos acerca de cuál es el estado actual de la sensibilidad de un patógeno en concreto ^(72, 83). Por otra parte, los estudios de tipificación de *S. maltophilia* son de necesaria aplicación para la identificación de fuentes ambientales o endógenas y la transmisión de cepas entre pacientes, permitiendo distinguir la adquisición de nuevas cepas y la aparición de variantes más resistentes posteriores al tratamiento antibiótico ⁽²³⁾.

Las técnicas fenotípicas utilizadas en los estudios epidemiológicos, perfil bioquímico y de sensibilidad a antimicrobianos, han resultado ser poco efectivas debido a que *S. maltophilia* posee un metabolismo relativamente inerte y a la homogeneidad que presenta en su patrón de resistencia. El tipado serológico no aporta mayores ventajas dada la alta frecuencia de aparición de tres serotipos (10, 3 y 19, en orden de incidencia) respecto a los 31 serotipos definidos ⁽⁷³⁾. Así mismo, la espectrofotometría de pirólisis de masas es una técnica que no se emplea para la investigación epidemiológica debido a su alto coste y complejidad de realización.

En comparación con los anteriores, los métodos genotípicos basados en el análisis de los fragmentos de restricción (RFLP) o en la amplificación de regiones cromosómicas (PCR) proporcionan una mayor discriminación. La restricción de ADN con endonucleasas, con mayor o menor frecuencia de corte, permite comparar diferentes perfiles de bandas o RFLP característicos de cada cepa. La baja resolución de los numerosos fragmentos generados tras la digestión con enzimas de corte frecuente y separados mediante electroforesis convencional (REA, análisis con endonucleasas de restricción) dificulta su interpretación. Para resolver este problema se desarrolló la ribotipificación o hibridación de los ácidos nucleicos con sondas que contienen el operón *rrnB* de *E. coli*, que porta los genes que codifican los ARN 5S, 16S, 23S y el ARNt, y que es una técnica que proporciona un gran número de patrones de bandas (ribotipos), estables y reproducibles facilitando, de tal forma, la diferenciación entre cepas de una misma especie ⁽⁷⁴⁾.

La ribotipificación se ha sustituido por otras técnicas genotípicas de menor complejidad de realización, como la PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, electroforesis en campo pulsante). Desarrollada por Schawrtz y Cantor en 1984, es una optimización de la electroforesis convencional en gel de agarosa, en la cual la orientación del campo eléctrico no es unidireccional, sino que se va alternando en distintos periodos temporales. La migración del DNA se realiza en una matriz de agarosa y depende del tiempo de electroforesis, de los cambios en el

campo eléctrico, el voltaje, el ángulo del campo y el tiempo de electroforesis ⁽⁷⁵⁾. En este tipo de electroforesis el campo eléctrico cambia rítmicamente en forma de breves pulsos obligando a las moléculas de DNA a cambiar constantemente de dirección o a reorientarse según su carga. Las moléculas más grandes tardan más en reorientarse y, por tanto, tienen menos tiempo para moverse durante el pulso, migrando más despacio que los fragmentos menores. De esta forma, al tratarse de una técnica altamente discriminadora, se consigue mejorar significativamente la resolución de las bandas.

Hasta el momento la PFGE se considera como una técnica que proporciona la diferenciación definitiva de las cepas de *S. maltophilia*, siendo empleada ampliamente en el estudio de brotes nosocomiales por su gran capacidad discriminadora y su buena reproducibilidad ^(25, 76, 77). Al igual que sucede con la ribotipificación, la utilización de diferentes endonucleasas y de distintas condiciones de electroforesis puede variar su efectividad en la diferenciación de pulsotipos. Las enzimas de corte más utilizadas son, fundamentalmente, *DraI*, *SpeI* y *XbaI*, siendo esta última la más efectiva en la diferenciación de cepas con pulsotipos muy semejantes ^(4, 78, 79).

· 1.5.3. Tratamiento de elección

A pesar de las limitaciones relacionadas con la sensibilidad y la multirresistencia de *S. maltophilia* a los antimicrobianos, la bibliografía existente proporciona recomendaciones para el tratamiento de colonizaciones/infecciones asociadas a este patógeno. Numerosos estudios presentan al trimetoprim-sulfametoxazol -o cotrimoxazol- como el antimicrobiano de mayor eficacia demostrada frente a la mayoría de las cepas y, por tanto, es considerado como el fármaco de elección en caso de infección por *S. maltophilia* ^(19, 22, 23, 65, 68, 72). El principal inconveniente de trimetoprim-sulfametoxazol es que sólo ejerce un efecto bacteriostático frente a la mayoría de las cepas. Debido a su carácter bacteriostático, se ha recomendado su uso a la

dosis máxima tolerada ⁽⁸⁰⁾, lo cual supone una limitación a esta opción terapéutica dada la toxicidad del componente sulfonamida de la combinación ^(4, 81).

El problema de toxicidad, así como el aumento de resistencias a cotrimoxazol (trimetoprim-sulfametoxazol) ^(19, 22, 82, 83), supuso el empleo para el tratamiento de infecciones por *S. maltophilia* de otros antimicrobianos como son las nuevas fluoroquinolonas y la combinación de ticarcilina-ácido clavulánico, que en diferentes trabajos demostraron su eficacia frente a este patógeno ^(54, 64, 81). Sin embargo, Vartivarian y cols. ⁽⁸⁰⁾ determinaron un incremento secuencial de la resistencia de *S. maltophilia* a ciprofloxacino y ticarcilina-ácido clavulánico debido al cambio de mentalidad en el tratamiento de los pacientes con algún tipo de cáncer en detrimento del cotrimoxazol, lo que supuso un freno en el aumento de resistencia a este agente. Estos resultados han sido avalados por posteriores estudios ⁽⁸⁴⁾.

De cualquier forma, en caso de intolerancia a cotrimoxazol el fármaco de elección es ticarcilina-ácido clavulánico dada la existencia de numerosos estudios que muestran una buena actividad de esta combinación frente a *S. maltophilia*, así como sinergia a concentraciones terapéuticas ^(19, 53, 54, 72). En la misma línea, otras combinaciones estudiadas de betalactámico con inhibidor de betalactamasa son: piperacilina-tazobactam, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam, aztreonam-sulbactam, aztreonam-tazobactam y ácido clavulánico combinado con carbenicilina, imipenem, ceftazidima o aztreonam ^(53, 54, 83, 85). De todas estas combinaciones, sólo aztreonam-ácido clavulánico a concentraciones 2:1 y 1:1 han mostrado un incremento de la actividad frente a *S. maltophilia*; sin embargo, las diferencias farmacocinéticas de estos dos componentes hacen que los niveles de ácido clavulánico disminuyan en plasma más rápidamente que los de aztreonam y, por tanto, su aplicabilidad clínica queda limitada ^(83, 85).

Como consecuencia de los fallos terapéuticos observados con las monoterapias en algunos casos, y con el fin de evitar la emergencia de resistencias durante el tratamiento, se ha propuesto el uso de combinaciones de varios antimicrobianos que han demostrado su eficacia *in*

vitro. Otros beneficios adicionales al emplear combinaciones de antimicrobianos serían, tal y como indican Eliopoulos y Moellering ⁽⁸⁶⁾, su aplicabilidad en casos de infecciones polimicrobianas y la posibilidad de reducir los efectos adversos asociados a un antimicrobiano al poder reducir la dosis del mismo y, con ello, su toxicidad. Entre las combinaciones que han demostrado tener una actividad sinérgica *in vitro* se han descrito cotrimoxazol y ticarcilina-ácido clavulánico, la combinación de cualquiera de estos últimos con cefalosporinas de 3ª generación, cefalosporinas y quinolonas e incluso la triple combinación de cotrimoxazol con ticarcilina-ácido clavulánico y minociclina, por ejemplo ^(19,23, 24, 68,87).

Pese a que no se dispone de demasiados datos referentes al uso de combinaciones en la práctica clínica, Muder y cols. ⁽⁸⁸⁾ han detectado una significativa reducción en la mortalidad de pacientes que han recibido terapia combinada de varios antimicrobianos respecto a aquellos que han sido tratados con monoterapia.

1.6. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS: DESARROLLO DE SISTEMAS PK/PD

Desde el comienzo de la era antibiótica en la década de los 50 el arsenal de antimicrobianos ha ido creciendo y, con ello, ha sido posible salvar infinidad de vidas humanas. Por otro lado, la disponibilidad de antibióticos para tratar las infecciones ha determinado la pérdida de eficacia de éstos en muchos casos. Esta pérdida de eficacia se produce porque la exposición de los patógenos a la terapia antibiótica supone una presión de selección continua sobre los microorganismos presentes en el individuo, bien produciendo una infección o formando parte de la flora microbiana, tanto en centros sanitarios como en la comunidad o el ambiente. Esta presión actúa favoreciendo a los patógenos capaces de adquirir resistencia mediante mutaciones espontáneas y/o la adquisición de determinantes genéticos de resistencia de otros organismos ⁽⁸⁹⁾.

Con el fin de evitar posibles fallos terapéuticos, desde el desarrollo de la farmacodinamia en la década de los 80, los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antimicrobianos han cobrado gran relevancia como fuente de información para optimizar la eficacia clínica y microbiológica, minimizar la presión de selección para evitar el desarrollo de resistencias y determinar un régimen posológico adecuado ⁽⁹⁰⁾.

A la hora de elegir un antimicrobiano (o combinación) como opción terapéutica para el tratamiento de una infección se deben considerar tanto la sensibilidad en nuestro medio del microorganismo, como los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos. La elección óptima sería una formulación que permitiese alcanzar y mantener concentraciones plasmáticas más elevadas, un menor número de administraciones diarias y una menor incidencia de efectos adversos.

· 1.6.1. Valoración de nuevas moléculas o estrategias terapéuticas

La investigación de nuevas moléculas o estrategias terapéuticas generalmente se basa en la realización de estudios de sensibilidad por medio de técnicas convencionales, o bien en el desarrollo de curvas de muerte bacteriana. Las curvas de muerte bacteriana obedecen a criterios de reducción de inóculo, de manera que permiten observar los posibles recrecimientos del microorganismo durante las pautas más usuales de administración de antibiótico ^(23, 86). Sin embargo, al inconveniente que supone la variabilidad en los resultados de sensibilidad en *S. maltophilia* hay que sumar el hecho de que se trata de estudios que se realizan a concentraciones fijas sin tener, por tanto, en cuenta la farmacocinética del antimicrobiano; esto determina que se trate de técnicas meramente orientativas de la actividad real, de forma que es necesario complementar con técnicas más aproximativas.

Una alternativa capaz de ofrecer resultados similares a los documentados en humanos sería la experimentación animal. Sin embargo, existen estudios que dejan patente la dificultad de

trabajar con *S. maltophilia* en experimentación animal. El inconveniente para realizar este tipo de estudios radica en la propia dificultad existente a la hora de diferenciar entre infección y colonización por *S. maltophilia* en el ser humano, y más aún para poder reproducirlo en animales de experimentación ⁽²³⁾.

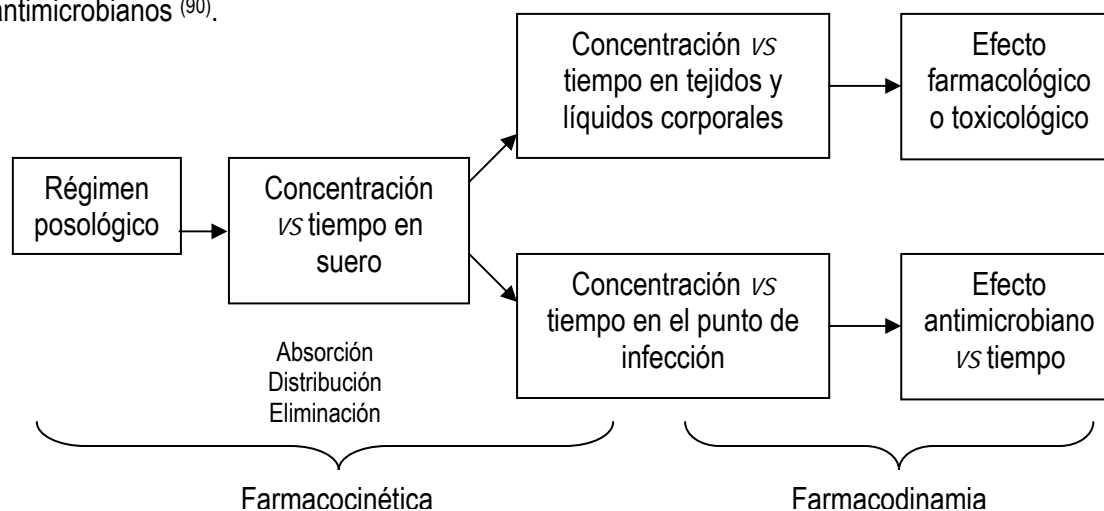
A lo largo de la última década se han venido constatando las posibilidades de los sistemas farmacodinámicos en la valoración de actividad de diferentes fármacos. Estos sistemas permiten reproducir la farmacocinética del antimicrobiano de acuerdo a las pautas de eliminación observadas en humanos y valorar la farmacodinamia desarrollada sobre un microorganismo en particular a lo largo del intervalo de dosificación ⁽⁹¹⁾. Los resultados obtenidos con los sistemas *in vitro* no difieren de los observados con animales de experimentación o humanos, permiten el estudio de resistencias, imposibles de realizar mediante los modelos animales y evitan el componente ético de este tipo de investigaciones.

Un último paso en la valoración de la viabilidad de nuevos antimicrobianos o nuevas estrategias terapéuticas es la realización de ensayos clínicos en humanos. En estos estudios se recopilan los datos correspondientes a una población determinada para poder ser empleados como referencia a la hora de elegir la opción terapéutica más adecuada y determinar la dosificación óptima ⁽⁹²⁾.

· 1.6.2. Definición de algunos términos de interés

Las bases de la farmacoterapia clínica son la farmacocinética, la farmacodinamia y la farmacovigilancia ⁽⁹³⁾. La farmacocinética (PK) describe la circulación del fármaco por el organismo desde la absorción -que condiciona la biodisponibilidad-, el transporte –principalmente por vía hemática, unido a proteínas plasmáticas-, la distribución tisular, la biotransformación, hasta su eliminación ⁽⁹³⁾. La farmacodinamia (PD) estudia la relación entre las concentraciones en suero, tejidos y fluidos corporales, y los efectos farmacológicos y toxicológicos del fármaco, así como el efecto antimicrobiano sobre el patógeno ^(90, 94).

Figura 1. Esquema de la interacción de farmacocinética y farmacodinámica de agentes antimicrobianos ⁽⁹⁰⁾.

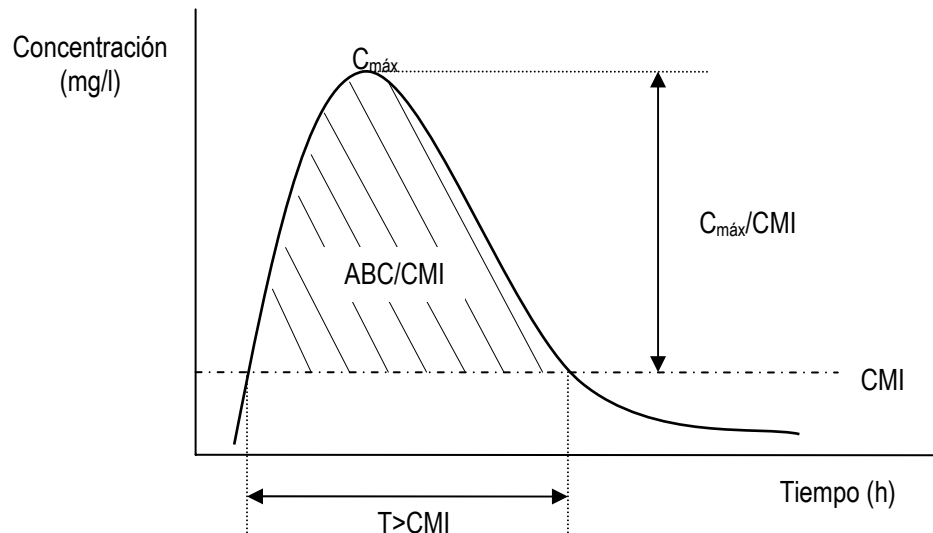


En relación con el esquema anterior (figura 1), los sistemas de farmacovigilancia se han constituido para estudiar la eficacia y la seguridad de los medicamentos.

La precisión a la hora de calcular la dosis de antibiótico a administrar, su frecuencia y la duración total del tratamiento se ve generalmente reducida; esto se debe al desconocimiento sobre numerosos factores que pueden condicionar dichas decisiones. En la actualidad se sabe que ciertas aproximaciones farmacodinámicas pueden ayudar a seleccionar la dosis de un antibiótico y su frecuencia de administración ⁽⁹⁵⁾. En relación con esto, y teniendo en cuenta la figura 2, cabe destacar la definición de una serie de factores farmacocinéticos de interés ⁽⁹⁴⁻⁹⁸⁾:

Volumen de distribución (V_d): una vez absorbido el antimicrobiano, éste se distribuye desde la sangre a diferentes tejidos y otros fluidos (espacio extravascular). Para la distribución, el cuerpo se divide en compartimentos dependiendo de la vascularidad tisular. La concentración del fármaco alcanza el equilibrio en cada compartimento a diferentes tasas (depende de la tasa de perfusión sanguínea del órgano). Este término relaciona la cantidad del antimicrobiano en el cuerpo con su concentración en plasma.

Figura 2. Relaciones farmacodinámicas comunes entre la farmacocinética y la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos.



Aclaramiento (Cl): el aclaramiento corporal del antimicrobiano se refiere al factor de proporcionalidad entre la tasa de eliminación de un fármaco del cuerpo y la concentración plasmática.

Vida media ($T_{1/2}$): vida media de eliminación del antimicrobiano.

Concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$): máxima concentración de antimicrobiano alcanzada en el compartimento de referencia tras la administración de una determinada dosis.

$T_{m\acute{a}x}$: tiempo requerido para alcanzar la $C_{m\acute{a}x}$.

Área bajo la curva (ABC): área bajo la curva de la concentración del antibiótico (en suero, plasma o LCR) respecto al tiempo desde 0 h (inicio del tratamiento) hasta 24 h, salvo que se especifique otro período de estudio. Este parámetro integra, por tanto, las concentraciones de antimicrobiano respecto al tiempo, y depende no sólo de la dosis sino de la vía de administración.

Tasa de unión a proteínas: la mayoría de los antibióticos se unen a proteínas plasmáticas; sólo la fracción libre es microbiológicamente activa y tiene capacidad para difundir a espacios extravasculares, donde ocurren la mayoría de las infecciones.

En cuanto a la interacción del fármaco con el microorganismo (farmacodinamia), los antimicrobianos se clasifican en tres grupos principales en función de la actividad y la duración del efecto bactericida de los mismos ⁽⁹⁴⁻⁹⁹⁾.

1.- Antimicrobianos cuyo efecto está directamente relacionado con la concentración plasmática alcanzada. Conocidos como antibióticos “concentración-dependiente”, muestran una mayor actividad clínica cuando se administran en dosis elevadas, con independencia del intervalo de administración, pudiendo llegar a administrarse una única dosis diaria. El índice que mejor define esta relación es el cociente inhibitorio ($C_{m\acute{a}x}/CMI$), que hace referencia a la proporción de la máxima concentración sérica detectada respecto a la CMI para el microorganismo. No tiene dimensiones. Pertenecen a este grupo: aminoglucósidos, fluoroquinolonas, daptomicina, vancomicina, teicoplanina y anfotericina B.

2.- Antimicrobianos cuya eficacia depende de la concentración alcanzada y el tiempo que ésta se mantiene. Presentan una elevada distribución, por lo que su concentración plasmática es reducida. El índice que mejor define esta relación es ABC/CMI , que hace referencia a la proporción de la concentración de antimicrobiano en sangre en el área bajo la curva de 24 horas *versus* tiempo de la curva, respecto a la CMI para el microorganismo; de esta forma se encuentra una relación directa entre el efecto antibacteriano del antimicrobiano y su farmacocinética. Pertenecen a este grupo: aminoglucósidos, fluoroquinolonas, daptomicina, vancomicina, ketólidos, quinupristin-dalfopristin, tetraciclinas, fluconazol. La relación existente entre ABC/CMI y $C_{m\acute{a}x}/CMI$ en ocasiones dificulta la valoración de la eficacia de algunos antibióticos “concentración-dependientes”.

3.- Antimicrobianos cuyo efecto depende del mantenimiento de concentraciones superiores a la CMI durante el mayor tiempo posible. A los antimicrobianos comprendidos en este grupo se les denomina “tiempo-dependientes”. El índice que mejor define esta relación es $T > CMI$, que es el tiempo durante el cual la concentración de antimicrobiano en suero supera la CMI para el microorganismo. Se mide como porcentaje de un periodo temporal determinado, generalmente 24 horas. Este parámetro farmacodinámico está relacionado con la eficacia para betalactámicos, macrólidos, clindamicina y oxazolidinonas.

OBJETIVOS

A partir de la década de los 80 comienzan a publicarse numerosos trabajos que comunican un aumento de la frecuencia de los aislamientos de *S. maltophilia* en muestras clínicas, así como la aparición de brotes epidémicos nosocomiales causados por este microorganismo. Estos hechos, junto a su característica resistencia intrínseca a la mayoría de los antimicrobianos, le han hecho adquirir importancia como patógeno nosocomial emergente.

La situación ocasionada por *Acinetobacter baumannii* y otros microorganismos multirresistentes (la utilización, por tanto, de antibioterapia de amplio espectro) en nuestros hospitales estaría creando las condiciones ideales para la emergencia de *Stenotrophomonas maltophilia*.

En relación con la sugerencia realizada por Hanes y cols. ⁽¹⁸⁰⁾, según la cual “los pacientes no mueren como consecuencia de una neumonía por *S. maltophilia*, sino por la falta de un tratamiento empírico adecuado frente al microorganismo”, el trabajo presentado en esta memoria trata de participar en la necesaria búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de colonizaciones/infecciones causadas por *Stenotrophomonas maltophilia*, dadas las limitadas opciones terapéuticas, los efectos secundarios producidos por los antimicrobianos que se emplean como terapia de elección y el aumento de cepas resistentes a los mismos en dichas colonizaciones/infecciones. El fin de este estudio es comprobar si nuevas combinaciones betalactámico-inhibidor de betalactamasas alcanzan, como mínimo, los resultados obtenidos con los actuales tratamientos de elección, ofreciendo menores tasas de resistencia y perfilándose, de tal forma, como una opción terapéutica a tener en cuenta a la hora de tratar infecciones causadas por este patógeno.

Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterizar fenotípica y genotípicamente los aislamientos clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* recogidos para el estudio (n=125).

2. Determinar la actividad antimicrobiana de cefepima sola o en combinación con agentes inhibidores de betalactamasas frente a aislados clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia*. Comparación de los resultados con la actividad desarrollada por otras combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas, así como con otros antimicrobianos (quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos, entre otros).

3. Estudiar la actividad bactericida de combinaciones betalactámico-inhibidor de betalactamasas frente a tratamientos de elección mediante curvas de muerte bacteriana, como primera aproximación en la búsqueda de un tratamiento eficaz para combatir colonizaciones/infecciones causadas por *S. maltophilia*. Comparación de estos resultados con asociaciones clásicas de quinolonas y cefalosporinas.

4. Aplicación de sistemas farmacodinámicos como 2ª aproximación a un tratamiento eficaz de tres dosis (equivalente a 24 horas de tratamiento) de cefepima sola y en combinación (CFP 2000 mg en combinación con A/C 1000-200 mg), como la asociación más activa derivada de los puntos 2 y 3 (comb.1), sobre aislados previamente seleccionados, y comparándola con la desarrollada por ticarcilina-ácido clavulánico (como la asociación más activa hasta el momento en el tratamiento con betalactámicos-inhibidores de betalactamasas frente a este patógeno) y ceftazidima (cefalosporina de 3ª generación).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS

Para la realización del presente estudio se partió de un total de 125 aislamientos de *Stenotrophomonas maltophilia*, recogidos en diversos hospitales del territorio nacional en el período comprendido entre los años 1999-2002. La procedencia geográfica de los aislamientos totales recogidos fue la siguiente:

- Hospital Puerta de Hierro (Madrid), n= 5
- Hospital Gregorio Marañón (Madrid), n= 16
- Hospital Nacional de Paraplégicos (Toledo), n= 28
- Hospital Severo Ochoa (Madrid), n= 11
- Hospital Ramón y Cajal (Madrid), n= 2
- Hospital Clínico San Carlos (Madrid), n= 19
- Hospital Provincial Alcázar de San Juan (Ciudad Real), n= 2
- Clínica Moncloa (Madrid), n= 3
- Hospital Universitario de Zaragoza (Zaragoza), n= 8
- Hospital Clínico Universitario de Salamanca (Salamanca), n= 21
- Otros (centros únicos), n= 10

Las fuentes biológicas de aislamiento fueron las siguientes:

- Origen ambiental, n= 1
- Exudados, n= 12
- Hemocultivos, n= 18
- Muestras respiratorias, n= 57
- Orina, n= 37

3.2. IDENTIFICACIÓN Y TIPADO DE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Stenotrophomonas maltophilia*

· 3.2.1. Identificación bioquímica

Todos los aislados clínicos fueron identificados mediante sistemas automatizados PASCO (Difco, Detroit, Mich.) en los hospitales de origen y posteriormente se confirmó la identificación preliminar mediante API-20NE (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France).

Hasta su análisis las cepas se conservaron congeladas en viales de “Skim milk” (Difco, Detroit, Mich.) a -70° C. Para su recuperación se descongelaron alícuotas y se realizó una siembra de las mismas en placas de agar Mueller-Hinton suplementadas con un 5% de sangre de carnero. Las placas así inoculadas se incubaron durante 24 horas en estufa a 35° C en condiciones de aerobiosis.

· 3.2.2. Tipificación genotípica:

Los aislados clínicos identificados como *S. maltophilia* fueron caracterizados genéticamente mediante el análisis de los fragmentos de restricción del ADN cromosómico, por medio de electroforesis en campo pulsado (PFGE) con el sistema CHEF-DRII (Bio-Rad, Madrid) de acuerdo con el método descrito por Denton y cols. ⁽⁴⁾ para la tipificación de *S. maltophilia*, pero con las siguientes modificaciones: i) para la extracción del ADN partimos de un cultivo fresco de 18 horas en medio sólido de agar sangre; ii) se mide, por espectrofotometría a 420 nm de longitud de onda, la cantidad de inóculo a resuspender al 1% con agarosa multipurpose (Roche) para la realización de los bloques, obteniéndose una absorbancia comprendida entre el intervalo 0,9-1,1; iii) se incuban los bloques con la solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 50 mM EDTA, 1% (w/v) de lauril-sarcosil) y 1 mg/ml de proteinasa K, durante 2 días a 56° C, con recambio de solución; iv) se procede a realizar al menos 4 lavados de los

bloques con TE pH 7,2, y se almacenan a 4° C. Estos pasos correspondieron al proceso de obtención del ADN cromosómico.

Para la digestión del ADN se cortaron porciones de bloques del ADN embebido en agarosa y se estabilizaron con 100 µl de buffer de la enzima, durante 15-20 min. a 4° C. El ADN fue digerido en 100 µl de mezcla de digestión con 30U/ml de la enzima *XbaI* (Amersham Pharmacia Biotech), incubándose durante aproximadamente 18 horas a 37° C.

Para la separación de los fragmentos de ADN, se cargaron los bloques en agarosa multipurpose al 1% en tampón TBE 0,5x pH (TBE 10X: 44,5 mM tris-borato/ EDTANa₂ 1 mM pH8). Las condiciones de electroforesis empleadas fueron las siguientes (tabla 1):

Tabla 1: Condiciones de electroforesis

<i>XbaI</i>	Pulsos inicial→final	Tiempo	Voltaje	Temperatura
Bloque 1	10sg→60sg	24 horas	5,4 V/cm (180 V)	12° C
Bloque 2	5sg→20sg	5 horas	5,4 V/cm (180 V)	12° C

Como control de peso molecular se utilizó el “Lambda DNA Ladder- CHEF DNA Size Standards” (BIO-RAD Laboratorios) con el rango 48,5-1000 kb. Los geles de agarosa se tiñeron, durante 45 minutos, en una solución de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,5 µg/ml. A continuación se lavaron en agua destilada (al menos 20 minutos) para eliminar el bromuro de etidio no unido al ADN bacteriano. La visualización de los fragmentos de ADN se realizó en un trans-iluminador de luz ultravioleta, para posteriormente fotografiarlos con el sistema Gel Doc 2000 (BIO-RAD Laboratorios).

Para la definición de los perfiles de PFGE los fragmentos de restricción fueron comparados visualmente e interpretados de acuerdo con el criterio establecido por Tenover y cols. ⁽¹⁰⁰⁾. Este criterio contempla como cepas: *indistinguishables*, cuando no existen diferencias ni

en el número ni en la posición de las bandas; *relacionadas* con 2-3 diferencias en bandas de ADN; *posiblemente relacionadas*, 4-6; y *diferentes* con 7 bandas o más de diferencia.

Como cepa de referencia se utilizó *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637.

- 3.2.3. Análisis de los datos de tipificación:

- 3.2.3.1. Índice de discriminación

El índice numérico de discriminación (ID), nos da la probabilidad de que dos cepas no relacionadas, tomadas de la población analizada, se sitúen en diferentes grupos de tipificación y viene determinado por el número de tipos definidos por el método aplicado y la frecuencia relativa de esos tipos. Se calcula por el índice de la diversidad de Simpson conforme a la siguiente ecuación ⁽¹⁰¹⁾:

$$ID = 1 - [S \sum n_j (n_j - 1) / N(N-1)]$$

N: número total de cepas en la muestra

S: número total de tipos descritos

n_j: número de cepas pertenecientes al tipo "j".

Presenta un valor que oscila entre 0 y 1, de forma que un valor de 1 nos indicaría que si se seleccionasen al azar en la población de estudio dos aislados no relacionados, en el 100% de las repeticiones de la técnica de tipado, estarían en distintos grupos de tipificación.

- 3.2.3.2. Relación filogenética

El análisis de convergencia genética entre los diferentes genotipos obtenidos mediante PFGE se realizó por la determinación del grado de similitud entre los perfiles de bandas observados, para lo cual se empleó un método cualitativo que consiste en codificar la presencia o ausencia de bandas en el perfil como 1 ó 0, respectivamente ⁽¹⁰²⁾. Estos datos fueron

procesados aplicando el coeficiente de similitud de Dice ⁽¹⁰³⁾, que expresa la proporción de fragmento de ADN compartidos entre dos perfiles, empleando la siguiente fórmula:

$$S = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

n_x : número total de bandas del perfil “x”

n_y : número total de bandas de “y”

n_{xy} : número de bandas comunes entre los dos perfiles

Si se obtiene un valor de $S=1$ indica que los dos perfiles son idénticos. Del análisis resulta una matriz de similitud entre perfiles y un dendograma de similitud, o árbol filogenético de similitudes genéticas, que agrupa los perfiles más parecidos.

El índice de correlación de Dice se aplicó mediante el programa Diversity Database Software (Bio-Rad). Para el análisis de los patrones de bandas de PFGE fue necesario identificar las bandas automáticamente y posteriormente corregirlas de forma manual, especialmente cuando, de acuerdo al criterio de Tenover y cols. ⁽¹⁰⁰⁾, distintos aislados mostraron idénticos perfiles de restricción con *Xba*I. En el análisis sólo se incluyeron aquellos fragmentos con un peso molecular superior a los 48 Kbp, debido a que fragmentos inferiores no mostraron una buena resolución.

El dendograma resultante fue representado mediante UPGMA, método algorítmico de agregación, que permite representar gráficamente las relaciones entre las cepas en orden creciente de similitud. Las cepas con un perfil idéntico (100% de similitud genética) fueron consideradas cepas isogénicas, y clonalmente relacionadas cuando las similitudes genéticas fueron $\geq 80\%$ ⁽²⁵⁾. La posición de tolerancia utilizada fue del 1%.

- 3.2.3.3. Cálculo del peso molecular de los fragmentos de ADN

El cálculo del peso de los fragmentos obtenidos por PFGE se obtuvo directamente mediante el programa Quantity One Software (Biorad).

3.3. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

· 3.3.1. Agentes antimicrobianos

Los antibióticos evaluados, así como sus correspondientes laboratorios fabricantes, se muestran en la tabla 2.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de cefepima, ceftazidima, ticarcilina y aztreonam se determinaron, además, en presencia de concentraciones fijas de ácido clavulánico (Glaxo SmithKline) de 0,5, 1 y 2 mg/l; también se estudió la combinación aztreonam-ácido clavulánico en proporción 2:1. Por otro lado, se estudió la combinación de cefepima y ceftazidima con concentraciones fijas de tazobactam (Wyeth Farma) de 8 mg/l, y piperacilina combinada con concentraciones fijas de 4 mg/l de este mismo inhibidor. Finalmente, también fue determinada la CMI de cefepima, ceftazidima y ticarcilina en presencia de concentraciones fijas de sulbactam (Farmasierra) de 4 mg/l.

Los antibióticos antes mencionados fueron proporcionados por sus respectivos laboratorios fabricantes, como sustancias valoradas y potencia conocida.

Los antibióticos fueron preparados con los solventes recomendados por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) ⁽¹⁰⁴⁾ inmediatamente antes de su empleo.

· 3.3.2. Test de sensibilidad a antimicrobianos: determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) correspondiente a los diferentes antimicrobianos, así como a las diferentes combinaciones, fueron determinadas por el método de dilución en agar descrito por el CLSI ⁽¹⁰⁵⁾, y recomendada por Pankuch y cols. ⁽⁵³⁾ por su mejor correlación con los estudios de curvas de muerte, empleando agar Mueller-Hinton como medio de cultivo.

Tabla 2: Antimicrobianos estudiados en el perfil de sensibilidad, y laboratorios fabricantes.

Antimicrobiano	Laboratorio	Antimicrobiano	Laboratorio
Aminoglicósidos		Quinolonas	
Amikacina	Sigma-Aldrich	Gemifloxacino	Glaxo SmithKline
Gentamicina	Sigma-Aldrich	Levofloxacino	Aventis Pharma
Tobramicina	Duchefa Biochemie BV	Moxifloxacino	Bayer Pharmaceuticals
Betalactámicos		Norfloxacino	Sigma-Aldrich
Aztreonam	Bristol-Myers Squibb	Ofloxacino	Sigma-Aldrich
Ceftazidima	Glaxo SmithKline	Trovafloxacino	Pfizer
Cefepima	Bristol-Myers Squibb	Tetraciclinas	
Imipenem	Merck-Sharp & Dohme	Doxiciclina	Sigma-Aldrich
Meropenem	Astra-Zeneca	Minociclina	Sigma-Aldrich
Piperacilina	Wyeth Farma	Tetraciclina	Sigma-Aldrich
Ticarcilina	Glaxo SmithKline	Tigeciclina	Wyeth Farma
Macrólidos		Miscelánea	
Azitromicina	Pfizer	Cloranfenicol	Chemo Ibérica
Claritromicina	Abbott	Colistina	Sigma-Aldrich
Eritromicina	Sigma-Aldrich	Cotrimoxazol	Sigma-Aldrich
Quinolonas		Fosfomicina	Sigma-Aldrich
Ácido nalidíxico	Sigma-Aldrich	Linezolid	Pfizer
Ciprofloxacino	Bayer Pharmaceuticals	Polimixina B	Sigma-Aldrich
Clinafloxacino	Pfizer	Rifampicina	Sigma-Aldrich
Gatifloxacino	Grünenthal		

A partir de un cultivo bacteriano fresco puro obtenido en placas de agar sangre después de 18-24 horas de incubación a 35° C, se preparó una suspensión en solución salina (0,9%) con densidad óptica equivalente al 0,5 de McFarland que posteriormente se diluyó 1:10 para alcanzar una concentración final aproximada de $1 \cdot 10^7$ UFC/ml.

La inoculación de las placas se realizó por la denominada “técnica de multipunto” con replicador de Steers, de forma que el inóculo tenía una concentración final de 10^4 UFC/gota. La siembra se realizó en placas de agar Mueller-Hinton que contenían las concentraciones seriadas de cada antibiótico estudiado, y que fueron preparadas el día anterior a su inoculación y mantenidas a 4° C; como control, se emplearon placas de agar Mueller-Hinton sin antibiótico. Conforme a las recomendaciones del CLSI para *S. maltophilia*, la incubación se realizó a 35° C, realizando lectura de resultados a las 24 horas según describen Lecso-Bornet y cols. ⁽⁵⁴⁾ y a las 48 horas, propuestas por Carroll y cols. ⁽⁶⁷⁾ y Pankuch y cols. ⁽⁵³⁾.

· 3.3.3. Análisis e interpretación de los resultados

La CMI se definió como la concentración más baja de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano visible. Como cepas control se emplearon *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Para cada uno de los antibióticos estudiados se determinó la distribución de frecuencias, la CMI para el 50% (CMI₅₀) y el 90% (CMI₉₀) de las cepas de *S. maltophilia* recogidas, la moda, el rango de CMIs y el porcentaje de cepas intermedias, resistentes y sensibles.

Los porcentajes de resistencia fueron calculados de acuerdo con los puntos de corte propuestos por el CLSI en el documento M100-S17 ⁽¹⁰⁴⁾ para *Stenotrophomonas maltophilia* (tabla 2B-4 del citado documento); para los antimicrobianos no recogidos en la tabla anteriormente indicada, se emplearon los puntos de corte correspondientes a bacilos gramnegativos no fermentadores (tabla 2B-1 del mismo documento). En el caso de aquellos

Tabla 3: Concentraciones críticas (en mg/l) de sensibilidad (S) y resistencia (R) a los antimicrobianos ensayados.

Antimicrobiano	S	R	Antimicrobiano	S	R
Aminoglicósidos ^b			Quinolonas		
Amikacina	≤16	≥64	Gatifloxacino ^b	≤2	≥8
Gentamicina	≤4	≥16	Gemifloxacino ^d	≤1	≥4
Tobramicina	≤4	≥16	Levofloxacino ^a	≤2	≥8
Betalactámicos			Moxifloxacino ^c	≤2	≥4
Aztreonam ^b	≤8	≥32	Norfloxacino ^b	≤4	≥16
Ceftazidima ^a	≤8	≥32	Ofloxacino ^b	≤2	≥8
Cefepima ^b	≤8	≥32	Trovafloracino ^c	≤2	≥4
Imipenem ^b	≤4	≥16	Tetraciclinas		
Meropenem ^b	≤4	≥16	Doxiciclina ^b	≤4	≥16
Piperacilina ^b	≤16	≥128	Minociclina ^a	≤4	≥16
Piper-tazobactam (4) ^b	≤16/4	≥128/4	Tetraciclina ^b	≤4	≥16
Ticarcilina ^b	≤16	≥128	Tigeciclina ^f	≤2	≥8
Ticar-ác. clavulánico (2) ^a	≤16/2	≥128/2	Miscelánea		
Macrólidos			Cloranfenicol ^a	≤8	≥32
Azitromicina	- ^g	-	Colistina ^b	≤2	≥8
Claritromicina	-	-	Cotrimoxazol ^a	≤2/38	≥4/76
Eritromicina	-	-	Fosfomicina ^c	≤32	≥128
Quinolonas			Linezolid	-	-
Ácido nalidíxico	≤16	≥32	Polimixina B ^b	≤2	≥8
Ciprofloxacino ^b	≤1	≥4	Rifampicina ^e	-	≥4
Clinafloxacino ^c	≤1	≥4			

(a) CLSI *S. maltophilia*; (b) CLSI *P. aeruginosa* y otros no-*Enterobacteriaceae*; (c) Mensura bacilos gramnegativos no fermentadores; (d) Punto de corte de ciprofloxacino; (e) Giamarells-Bourboulis y cols. ⁽¹⁰⁸⁾; (f) Jones RN ⁽¹⁰⁹⁾; (g) “-” punto de corte no disponible.

antimicrobianos para los cuales el CLSI no recomendaba puntos de corte, se aplicó el propuesto por la “Mesa Española para la Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos” (MENSURA) ⁽¹⁰⁶⁾; para rifampicina y tigeciclina se emplearon los propuestos en publicaciones de referencia, con el fin de poder comparar su actividad (ver tabla 3). Para las combinaciones con inhibidores de betalactamasas no recogidas por el CLSI (cefepima, ceftazidima, aztreonam y ticarcilina combinadas, en cada caso, con sulbactam o tazobactam; así como las combinaciones cefepima-ácido clavulánico, ceftazidima-ácido clavulánico, aztreonam-ácido clavulánico y ticarcilina combinado con ácido clavulánico 0,5 mg/l y 1 mg/l), se ha empleado como punto de corte el correspondiente al antimicrobiano de forma aislada.

Una vez obtenidos los resultados de sensibilidad, se analizó estadísticamente (Test Chi-cuadrado) la diferencia entre los porcentajes de resistencia de los genotipos únicos, respecto a los datos obtenidos para el total de cepas de *S. maltophilia* recogidas. Asimismo, se analizó estadísticamente la posible diferencia en los resultados de sensibilidad al realizar la lectura de la CMI a las 24 y 48 horas. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

3.4. CURVAS DE MUERTE BACTERIANA

Los estudios de muerte bacteriana para la determinación de sinergismo entre los antibióticos combinados, así como para determinar dinámicamente el efecto de los antibióticos estudiados sobre *S. maltophilia*, se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) ⁽¹⁰⁷⁾.

· 3.4.1. Selección de cepas

Mediante curvas de muerte bacteriana se evaluaron las combinaciones que mayor actividad presentaron frente a los aislados de *S. maltophilia*, de acuerdo con el apartado “III.3”.

En base a los resultados de sensibilidad, la selección de cepas se realizó de manera que en el estudio de muerte bacteriana los aislados elegidos fuesen pulsotipos únicos y presentaran diferente sensibilidad a los antibióticos analizados.

- 3.4.2. Antimicrobianos testados

- 3.4.2.1. Combinación betalactámico-inhibidor de betalactamasas

Las combinaciones de antibiótico estudiadas incluyeron, por un lado cefepima-ácido clavulánico (concentración fija de ácido clavulánico de 2 mg/l) y ticarcilina-ácido clavulánico (concentración fija de ácido clavulánico de 2 mg/l); de la misma forma se estudió cefepima para comprobar el efecto del inhibidor de betalactamasas por comparación de la actividad que este antimicrobiano ejerce sobre el inóculo bacteriano respecto al desempeñado por la combinación betalactámico-inhibidor betalactamasas.

Las concentraciones de antibiótico simuladas fueron seleccionadas para representar las concentraciones terapéuticas alcanzables en el organismo *in vivo*, así se simularon: concentración máxima ($C_{\text{máx}}$ = cefepima: 163,9 mg/l ⁽¹¹⁰⁾ y ticarcilina: 324 mg/l ⁽¹¹¹⁾), 75% $C_{\text{máx}}$, 50% $C_{\text{máx}}$ y 25% $C_{\text{máx}}$, tanto para las combinaciones con ácido clavulánico (2 mg/l) como para los antimicrobianos de forma individual.

- 3.4.2.2. Combinación betalactámico-quinolona

De forma análoga a la anterior, se estudió la combinación clásica de cefepima con gatifloxacino ⁽⁸⁷⁾, así como el efecto antibacteriano ejercido por los antibióticos de forma aislada. Los aislados seleccionados fueron estudiados mediante curvas de muerte bacteriana a concentraciones que simulan sus respectivas $C_{\text{máx}}$ (CFP; 163,9 mg/l ⁽¹¹⁰⁾; GAT; 4 mg/l ⁽¹¹²⁾, 1xCMI y 2xCMI. Los resultados fueron simultáneamente comparados con la actividad de cefepima (simulando las concentraciones de $C_{\text{máx}}$, 75% $C_{\text{máx}}$, 50% $C_{\text{máx}}$ y 25% $C_{\text{máx}}$) en combinación con ácido clavulánico (2 mg/l).

· 3.4.3. Desarrollo de las curvas de letalidad

Para la preparación del inóculo se realizó una suspensión bacteriana a partir de 2-3 colonias de *S. maltophilia* (pase fresco) en matraces que contenían caldo fresco Mueller-Hinton suplementado con cationes (Difco), y se incubó a 35° C hasta alcanzar una concentración bacteriana final aproximada de $1 \cdot 10^6$ UFC/ml.

Cada una de las curvas de muerte se realizó en matraces individuales, en un volumen final de 8 ml, con caldo Mueller-Hinton suplementado con cationes (Difco). Cada matraz contenía el inóculo anteriormente preparado, así como las diferentes concentraciones de antimicrobiano simuladas (ver apartado III.4.2.). Para todos los antibióticos/combinaciones testados, se empleó un matraz adicional libre de antibiótico como control. Los matraces fueron incubados con agitación durante 24 horas a 35° C.

Se tomaron alícuotas de 200 μ l del control, así como de los restantes cultivos (concentraciones de antibiótico testadas), a los tiempos 0, 2, 4, 8 y 24 horas para comprobación de crecimiento bacteriano mediante diluciones decimales (1:10) seriadas en solución salina (9%) y posterior plaqueo. El recuento de células viables se realizó en placas de agar Mueller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de carnero; para ello se sembraron 20 μ l de cada dilución en su correspondiente placa y se incubaron las mismas a 35° C durante 24 horas.

La determinación de las curvas de letalidad se realizó por triplicado para cada antimicrobiano/combinación ensayado.

· 3.4.4. Interpretación de los resultados

Tras 24 horas de incubación a 35° C, se procedió al recuento de colonias y, con ello, a la obtención del número de UFC/ml correspondiente al control y a cada concentración de antibiótico testada para los diferentes tiempos analizados. El análisis de los datos se realizó en base a este recuento.

El efecto antibacteriano de cada antimicrobiano, así como el de las combinaciones con ácido clavulánico o con gatifloxacino, se midió calculando los cambios en la viabilidad de las bacterias, es decir, calculando la diferencia entre el \log_{10} UFC/ml de las bacterias tratadas a lo largo del tiempo respecto al \log_{10} UFC/ml de las bacterias al inicio del experimento (tiempo 0).

La actividad bactericida (máxima muerte bacteriana) se calculó como una reducción del inóculo inicial en las UFC/ml debida al tratamiento antimicrobiano, y se expresó como el porcentaje de reducción del inóculo inicial (RII), que se calculó mediante la expresión:

$$RII = 100 - (100 \times It/li)$$

Donde

It = inóculo en cada tiempo.

li = inóculo inicial.

Se considera que se alcanza la actividad bactericida cuando se consigue la eliminación del 99,9 % de los microorganismos o la disminución en 3 ó más \log_{10} de las UFC/ml.

Los resultados de la interacción de los antimicrobianos estudiados en combinación mediante curvas de muerte bacteriana, fueron interpretados de acuerdo a los criterios establecidos por Eliopoulos y Moellering ⁽⁸⁶⁾. Se consideró efecto sinérgico a una reducción de al menos 2 \log_{10} en el recuento de colonias correspondiente a la combinación a las 24 horas, respecto al recuento obtenido con el antimicrobiano más activo en solitario. Se consideró indiferencia a una disminución menor de 10 veces en el recuento de viables a las 24 horas con la combinación, comparada con la droga más activa de forma individual. Finalmente, se consideró antagonismo al incremento en al menos 2 \log_{10} en el recuento de colonias correspondiente a la combinación a las 24 horas, en comparación con el recuento obtenido con el antimicrobiano más activo.

Las diferencias en la actividad de los distintos tratamientos tras 24 horas de exposición fueron valoradas mediante el análisis de la varianza (ANOVA), con posterior test de Turkey, para múltiples comparaciones. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

3.5. SISTEMA FARMACODINÁMICO *IN VITRO*

· 3.5.1. Selección de cepas

En base a los resultados obtenidos en los anteriores análisis, se seleccionaron 4 aislados clínicos de *S. maltophilia* no relacionados desde un punto de vista epidemiológico, resistentes a cefepima (CFP) y ceftazidima (CTZ), y diferente sensibilidad a cotrimoxazol (TMP/SMX) y ticarcilina-ácido clavulánico (T/C).

· 3.5.2. Antimicrobianos y medios de cultivo

Los antibióticos ensayados fueron amoxicilina-ácido clavulánico (Glaxo SmithKline), cefepima, ticarcilina-ácido clavulánico y ceftazidima (ver tabla 2). Indicar que el empleo de amoxicilina en esta parte del estudio y, concretamente su presencia en la combinación cefepima-amoxicilina-ácido clavulánico, responde a que comercialmente no está disponible el ácido clavulánico de forma aislada.

En todos los casos, los antibióticos fueron proporcionados por sus respectivos laboratorios fabricantes, como sustancias valoradas y potencia conocida, y fueron preparados con los solventes recomendados por el CLSI ⁽¹⁰⁴⁾ inmediatamente antes de su empleo.

Como medios de cultivo se emplearon caldo Mueller-Hinton suplementado con cationes (Difco) y agar Mueller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de carnero.

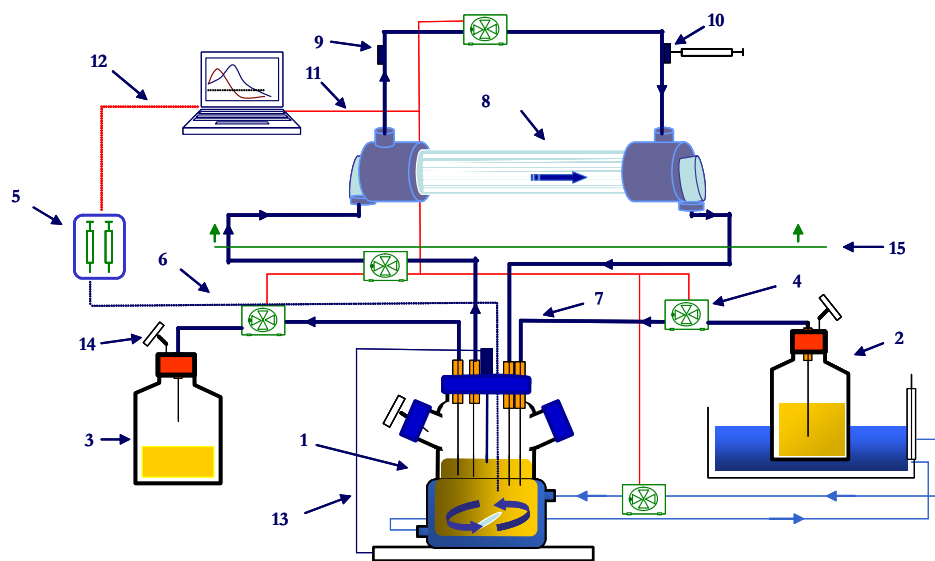
· 3.5.3. Sistema farmacodinámico *in vitro*: composición

Se empleó un sistema farmacodinámico de dos compartimentos, totalmente informatizado (ver figura 3), basado en el inicialmente propuesto por Blaser y cols. ⁽¹¹³⁾. El compartimento central estaba constituido por un frasco de doble camisa (Bellco Glass) donde se dispuso un volumen de 450 ml de caldo de cultivo (denominado volumen de distribución, V_d), la tubería de conexión y el interior de las fibras de un dializador con un volumen de cebado de 53 ml y una superficie de filtración de 1m^2 (FX50 class dialyzer, Fresenius Medical Care, Madrid). El compartimento periférico o de infección, donde era incubado el microorganismo, estaba formado por el espacio extracapilar del dializador y la tubería de recirculación externa. El elevado cociente entre la superficie de filtración y el volumen contenido en el dializador ($>200\text{ cm}^2/\text{ml}$) garantiza un rápido equilibrio de concentraciones entre ambos compartimentos.

Distintas bombas peristálticas (Masterflex; Cole-Parmer Instrument Company, Chicago III), programadas para simular la vida media del antibacteriano, empujaban el caldo de cultivo desde el reservorio de medio fresco, situado en el interior de un baño a 37°C , hacia el compartimento central, donde se iba realizando la dilución del antibiótico. Los antibióticos (disueltos convenientemente en sus diluyentes) fueron administrados mediante una bomba de dosificación (402 Dilutor Dispenser; Gilson S.A., Villiers-le-Bel, France), programada en flujo y volumen para alcanzar la concentración máxima ($C_{\text{máx}}$) en el tiempo máximo ($T_{\text{máx}}$) característico de cada antimicrobiano simulado. La mezcla era bombeada hacia el compartimento periférico a una velocidad constante de 50 ml/min , atravesaba el interior de los capilares de fibra hueca, y regresaba más tarde en sentido inverso a través de la segunda cápsula, hacia el compartimento central. Bombas adicionales movían la mezcla en el interior del compartimento periférico, a una velocidad constante de 25 ml/min . La unidad de filtración fue incubada a 37°C .

La eliminación del medio de cultivo a la misma velocidad de incorporación del medio fresco (se mantuvo el volumen constante), permitió simular la vida media de eliminación terminal ($T_{1/2}$) del antimicrobiano.

Figura 3: Sistema farmacodinámico *in vitro* bi-compartmental empleado



1. Compartimento central (Frasco Bellco de doble cámara), 2. Reservorio con caldo fresco, 3. Eliminación, 4. Bombas peristálticas, 5. Bomba de inyección, 6. Tubería PTFE, 7. Tubería de silicona, 8. Compartimento periférico (capsulas de fibra hueca), 9. Puerto de inoculación, 10. Puerto de muestreo, 11. Red RS-232, 12. Red GSIOC, 13. Sonda de temperatura conectada a baño termostatzado, 14. Filtros de aire y 15. Incubador.

· 3.5.4. Procedimiento experimental

Una administración intravenosa directa o en infusión se caracteriza por una corta primera fase de distribución o de rápido descenso de las concentraciones máximas y por una segunda fase más prolongada, o de eliminación, representada por la vida media de eliminación terminal. El descenso bi-exponencial de las concentraciones de ceftazidima, cefepima, ticarcilina-ácido clavulánico y amoxicilina-ácido clavulánico fue conseguido con el sistema *in vitro*, sincronizando a lo largo del periodo de dosificación en las bombas peristálticas, el aclaramiento (Cl) equivalente

a cada fase para un volumen de distribución (V_d) del sistema de 450 ml, mediante el programa Win Lin v. 2.0 (ColeParmer):

Ceftazidima: $Cl_1=4$ ml/min (periodo de 0-2 horas), $Cl_2=2,7$ ml/min (periodo 2-8 horas)

Cefepima: $Cl_1= 8,6$ ml/min (periodo de 0-1,5 horas), $Cl_2= 2,6$ ml/min (periodo 2-8 horas)

Ticarcilina-ácido clavulánico: $Cl_1= 9,1$ ml/min (periodo de 0-0,5 horas), $Cl_2= 5,2$ ml/min (periodo 0,5-6 horas)

Amoxicilina-ácido clavulánico: $Cl_1= 8,6$ ml/min (periodo de 0-1,5 horas), $Cl_2= 5,2$ ml/min (periodo 2-8 horas)

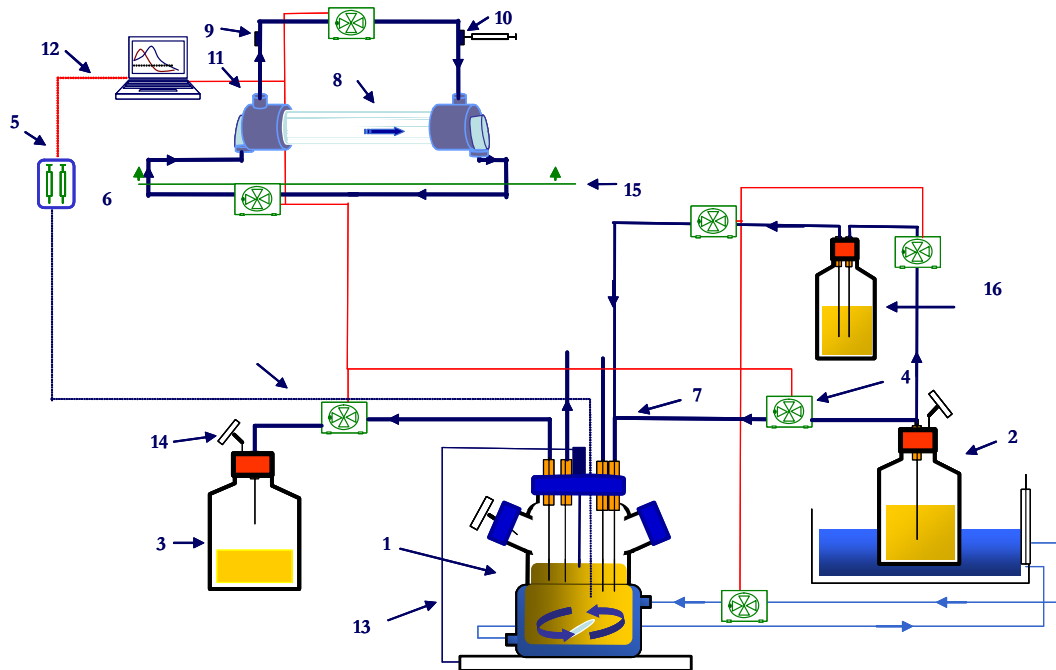
Cefepima (administración IC): $Cl= 5,2$ ml/min (0-24 horas); en combinación se emplearon los valores correspondientes a Amoxicilina-ácido clavulánico.

Ticarcilina-ácido clavulánico y amoxicilina-ácido clavulánico fueron simulados empleando una $t_{1/2}$ de 1 hora.

Para la simulación de la combinación cefepima+amoxicilina-ácido clavulánico, que incluye al menos dos antibacterianos con diferente vida media, se empleó una modificación del sistema farmacodinámico, en la que se incorporó a un nuevo compartimiento, denominado " V_s " o de suplemento ⁽¹¹⁴⁾ (ver figura 4). De acuerdo a las ecuaciones desarrolladas por Blaser y cols ⁽¹¹⁴⁾, el aclaramiento del proceso de dilución-eliminación (Cl_a) correspondió al aclaramiento de amoxicilina-ácido clavulánico, de menor vida media o mayor aclaramiento. El exceso de concentraciones eliminadas de cefepima, de mayor vida media o menor aclaramiento, fueron suplementadas simultáneamente desde el compartimiento V_s , a un aclaramiento (Cl_{a-b}) equivalente a la diferencia de los correspondientes a amoxicilina-ácido clavulánico y cefepima en el sistema. El V_d se mantuvo constante mediante la incorporación de medio de cultivo desde el reservorio de caldo fresco a un flujo equivalente al aclaramiento de cefepima (Cl_b).

Teniendo en cuenta el descenso bi-exponencial de cefepima y amoxicilina-ácido clavulánico, el sistema quedó configurado para simular la combinación cefepima + amoxicilina-ácido clavulánico de diferente vida media, en la forma; Cl_a : $Cl_1=8,6$ ml/min (periodo de 0-1,5 horas), $Cl_2=5,2$ horas (periodo de 1,5-8 horas), Cl_{a-b} : $Cl_1=0,0$ ml/min (periodo de 0-1,5 horas), $Cl_2=2,6$ ml/min (periodo de 1,5-8 horas) y Cl_b : $Cl_1=0,0$ ml/min (periodo de 0-1,5 horas), $Cl_2=2,6$ ml/min.

Figura 4: Sistema farmacodinámico *in vitro* bi-compartmental adaptado para la simulación de antimicrobianos con diferente semivida



1. Compartimento central (Frasco Belco de doble cámara), 2. Reservorio con caldo fresco, 3. Eliminación, 4. Bombas peristálticas, 5. Bomba de inyección, 6. Tubería PTFE, 7. Tubería de silicona, 8. Compartimento periférico (capsulas de fibra hueca), 9. Puerto de inoculación, 10. Puerto de muestreo, 11. Red RS-232, 12. Red GSIOC, 13. Sonda de temperatura conectada a baño termostatzado, 14. Filtros de aire, 15. Incubador, 16. Compartimento Vs.

Para la evaluación de la cinética del antibiótico, cefepima fue simulado en las mismas condiciones que cefepima + amoxicilina-ácido clavulánico, pero sin adición de amoxicilina-ácido clavulánico.

La infusión de ceftazidima o cefepima sola o en combinación con amoxicilina-ácido clavulánico fue conseguida empleando una bomba de infusión (Gilson, Villiers-le-Bel, France), programada en flujo y volumen para alcanzar la $C_{\text{máx}}$ en el $T_{\text{máx}}$ característico de cada antimicrobiano simulado. El compartimento V_s , de 450 ml de volumen, fue suplementado con una concentración de cefepima de 51,35 mg/l.

· 3.5.5. Dosis simuladas

Con los sistemas descritos se simularon, durante 24 horas, las dosis de ceftazidima, cefepima, ticarcilina-ácido clavulánico y de la combinación cefepima + amoxicilina-ácido clavulánico recomendadas para infecciones graves, de acuerdo a las semividas de eliminación en la fracción terminal de la curva de 1,9 h, 2 h, 1 h y de 2 h +1 h observadas en humanos ^(110, 111, 115, 116). Ceftazidima y cefepima fueron administrados en infusión (simula infusión endovenosa) de 0,5 horas a dosis de 2000 mg cada 8 horas ($C_{\text{máx}}$ 129 mg/l y 163,9 mg/l, respectivamente) y ticarcilina-ácido clavulánico y amoxicilina-ácido clavulánico (en la combinación cefepima+ amoxicilina-ácido clavulánico) fueron administrados directamente a dosis de 3000/100 mg cada 6 horas ($C_{\text{máx}}$ 324 mg/l / 8 mg/l para ticarcilina y ácido clavulánico) y de 1000/200 mg cada 8 horas ($C_{\text{máx}}$ 100 mg/l / 30 mg/l para amoxicilina y ácido clavulánico). Finalmente, cefepima también se administró en forma de infusión continua con una concentración constante de 23,5 mg/l durante las 24 horas de simulación, de tal forma que la concentración final simulada fue de 4000 mg.

De forma resumida, el esquema de las dosis que fueron simuladas es el siguiente:

- Cefepima infusión 0,5 horas (IV) 2000mg cada 8 horas
- Cefepima en infusión continua 4000 mg

- Cefepima IV 2000mg + amoxicilina-ácido clavulánico (Augmentine) *in bolus* 1000/200mg cada 8 horas

- Cefepima en infusión continua 4000 mg + amoxicilina-ácido clavulánico (Augmentine) *in bolus* 1000/200mg cada 8 horas

- Ticarcilina-ácido clavulánico IV 3100mg cada 6 horas

- Ceftazidima IV 2000mg cada 8 horas

· 3.5.6. Farmacocinética

Para la valoración farmacocinética de las dosis de antimicrobiano simuladas, se desarrollaron sistemas idénticos a los anteriormente explicados con la sola excepción de tratarse de sistemas libres de microorganismo. En este caso, a los tiempos antes señalados se extrajeron 200 µl de muestra para la determinación de los niveles de antibacteriano simulados empleando ensayo microbiológico (bioensayo). Estas muestras se mantuvieron congeladas a -50° C hasta su valoración mediante bioensayo.

Las pruebas se realizaron por duplicado para cada una de las dosificaciones de antimicrobiano ensayadas.

- 3.5.6.1. Farmacocinética teórica y práctica

Conforme a la bibliografía empleada como referencia, los parámetros farmacocinéticos en humanos buscados para las administraciones de cefepima 2000 mg en infusión endovenosa (0,5 h) (CFP 2000 IV), amoxicilina-ácido clavulánico 1000/200 mg IV (A/C 1000/200 IV), ceftazidima 2000 mg en infusión endovenosa (0,5 h) (CTZ 2000 IV), ticarcilina-ácido clavulánico 3000/100 mg IV (T/C 3000/100 IV) y cefepima 4000 mg en infusión continua (CFP 4000 IC) quedan expuestos en la tabla 4.

Con el fin de hacer posible la simulación de las diferentes dosis de antimicrobiano analizadas (ver apartado III.5.5), a partir de los datos procedentes de estudios en humanos (tabla 4) se realizó un trazado práctico. Este trazado práctico consistió en un ajuste para, empleando la metodología anteriormente descrita, representar con la máxima fidelidad posible los datos recogidos *in vivo* tomados como referencia (parámetros prácticos presentados en tabla 5). En el caso de ticarcilina-ácido clavulánico no hubo trazado práctico: se realizó una extrapolación directa de los datos en humanos. En los casos de cefepima y ceftazidima las modificaciones fueron mínimas (entre 0 y 5,69 mg/l para cefepima, y entre 0,3 y 7,4 mg/l para ceftazidima). Por último, para amoxicilina-ácido clavulánico fue necesario aumentar la concentración de amoxicilina a lo largo del proceso, con el fin de ajustar al máximo la concentración de ácido clavulánico simulada respecto a los datos publicados en humanos.

Tabla 4: Parámetros farmacocinéticos buscados para las administraciones de antimicrobiano estudiadas

	Cefepima 2000mg ¹	Amoxicilina 1000mg ²	Acido clavulánico 200mg ²	Ceftazidima 2000mg ³	Ticarcilina 3000mg ⁴	Acido clavulánico 100mg ⁴	Cefepima 4000mg ⁵ Cl
ABC _{total} (hr,mg/l)	284,8±30,6						411±45
C _{últ} (mg/l)	3,9	0,78	0,23	5	4	0,3	-
C _{máx} (mg/l)	163,9±25,3	100	28,5	129	324	8	-
C _{ss} (mg/l)	-	-	-	-	-	-	20,3±3,3
T _{últ} (h)	8	6	6	8	6	3,5	-
T _{1/2} (h)	1,99±0,21	1	1	1,9	1	1	2,3±0,7
T _{máx} (h)	0,5	-	-	0,5	-	-	-

1.-Maxipime, información de producto ⁽¹¹⁰⁾

2.- Augmentin, información de producto ⁽¹¹⁶⁾

3.- Fortaz, información de producto ⁽¹¹⁵⁾

4.- Timentin, información de producto ⁽¹¹¹⁾

5. - Burgess y cols.⁽¹¹⁷⁾

Tabla 5: Regímenes de dosificación simulados

Dosis simuladas	Cefepima 2000mg	Amoxicilina 1000mg	Ácido clavulánico 200mg	Ceftazidima 2000mg	Ticarcilina 3000mg	Ácido clavulánico 100mg	Cefepima 4000mg Cl
Parámetros prácticos ¹	C _{máx} : 163,9 C _{min} : 5,38 T _{1/2} : 2	C _{máx} : 99,7 C _{min} : 0,78 T _{1/2} : 1	C _{máx} : 30 C _{min} : 0,23 T _{1/2} : 1	C _{máx} : 129 C _{min} : 4,97 T _{1/2} : 1,9	C _{máx} : 324 C _{min} : 6 T _{1/2} : 1	C _{máx} : 8 C _{min} : 0,3 T _{1/2} : 1	C _{ss} : 23,5

(1)Concentraciones medidas en mg/l y tiempo medido en horas

- 3.5.6.2. Determinación de los niveles de antimicrobiano simulado: bioensayo

A tal efecto, todas las muestras fueron procesadas mediante ensayo microbiológico tridimensional (el antimicrobiano difunde desde un pocillo practicado en el agar de la placa) empleando las cepas indicadoras características (ver tabla 6), de acuerdo con los procedimientos descritos por Andrews y White ^(118, 119).

Tabla 6: Microorganismos indicadores empleados para el bioensayo de los diferentes antibióticos estudiados

Antimicrobiano	Microorganismo indicador	λ (nm)	Absorbancia	Intervalo lineal
Ácido clavulánico ^(a)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	640	0,04	4- 0,125
	ATCC 29665			
Amoxicilina ^(a)	<i>Micrococcus lutea</i>	630	0,2	1- 0,03
	ATCC 9341			
Cefepima ^(b)	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	64- 0,5
	ATCC 6633			
Ceftazidima ^(c)	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	64- 4
	ATCC 6633			
Ticarcilina ^(a)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	640	0,04	32- 2
	ATCC 23389			

(a) White y Andrews ⁽¹²⁰⁾; (b) Goudah y cols. ⁽¹²¹⁾; (c) Se empleó el mismo procedimiento que para cefepima

Todas las determinaciones presentaron un coeficiente de correlación mayor de 0,99, con un coeficiente de variación (%CV) de la prueba intra e inter-día menor de 4%.

Las diferentes pruebas se realizaron por duplicado.

· 3.5.7. Farmacodinamia: curvas de muerte bacteriana

Para la preparación del inóculo, 3-4 colonias, procedentes de un pase reciente en agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero, fueron suspendidas en un volumen de 150 ml de caldo Mueller-Hinton suplementado con cationes (Difco). La suspensión resultante fue incubada y monitorizada mediante espectrofotometría, hasta obtener una densidad óptica equivalente a una concentración final de 10^7 - 5×10^7 UFC/ml.

Un volumen de 60 ml del inóculo inicial en fase exponencial fue incorporado en el compartimento periférico. Desde este compartimento se extrajeron muestras de 500 μ l a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas, y se realizaron diluciones decimales (1:10) seriadas en solución salina (0,9%) y posterior plaqueo; el volumen restante de la muestra tomada a la hora 24 se congeló a -70° C para su posterior análisis. El recuento de células viables se realizó en placas de agar Mueller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de carnero; para ello se sembraron 20 μ l de cada dilución en su correspondiente placa y se incubaron las mismas a 35° C durante 24 horas.

Estas curvas de letalidad se realizaron por duplicado para cada una de las cepas y las dosificaciones de antimicrobiano ensayadas.

- 3.5.8. Análisis de los datos

- 3.5.8.1. Análisis de los datos farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos de los perfiles reproducidos fueron calculados empleando una aproximación no compartimental (modelo 201 para administraciones intravenosas o modelo 202 para administraciones en infusión) con el programa WinNonlin Professional v. 5.2 (Pharsight Corporation, Mountain View, California). EL ABC_{0-t} fue calculado mediante la regla lineal/logarítmica trapezoidal.

Por último, se compararon los perfiles farmacocinéticos de las dosis de antimicrobiano estudiadas, y se calculó el porcentaje de error en las concentraciones de antimicrobiano cometido a lo largo de las simulaciones de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{ error} = \frac{(\text{resultado observado} - \text{valor teórico})}{\text{valor teórico}} \times 100 \%$$

- 3.5.8.2. Valoración del efecto antibacteriano

El porcentaje del inóculo inicial reducido a un tiempo dado ($\%RII_t$) fue calculado a los tiempos 6, 8, 12 y 24 horas. Adicionalmente se expresó la reducción del número de viables (en \log_{10} UFC/ml) con respecto al inóculo inicial al tiempo 24 horas ($\Delta 24h$), y el tiempo requerido por cada tratamiento para alcanzar la actividad bactericida o reducción de 3 \log_{10} UFC/ml del inóculo inicial ($T_{99.9\%}$). Las diferencias en la actividad de los distintos tratamientos fueron valoradas mediante el test T-Student y el análisis de la varianza (ANOVA) para las comparaciones múltiples, con posterior test de Turkey. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

· 3.5.9. Comprobación del posible desarrollo/selección de resistencias tras la administración del tratamiento antibiótico

Para comprobar el posible desarrollo/selección de resistencias en el tratamiento con los betalactámicos estudiados, se valoró la posibilidad de cambios en la sensibilidad comparando la CMI modal correspondiente a cefepima y cefepima-ácido clavulánico frente a las cepas examinadas pre- y post-tratamiento, y se analizó el perfil poblacional frente a cefepima de las cepas post-tratamiento con cefepima IV 2000mg + amoxicilina-ácido clavulánico (Augmentine) IV 1000/200mg cada 8 horas, y con cefepima en infusión continua 4000 mg + amoxicilina-ácido clavulánico (Augmentine) IV 1000/200mg cada 8 horas.

Las cepas post-tratamiento correspondieron a las recogidas a la hora 24 de cada una de las simulaciones realizadas.

- 3.5.9.1. Sensibilidad post-tratamiento

Los antimicrobianos analizados fueron cefepima y cefepima-ácido clavulánico (2 mg/l), de acuerdo con el apartado “3.3.1”. La determinación de la CMI para las cepas pre- y post-tratamiento se realizó conforme queda descrito en el apartado “3.3.2”.

Como cepa de referencia se utilizó *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637.

- 3.5.9.2. Análisis del perfil poblacional

A partir de 2-3 colonias de un cultivo en placa fresco se realizó una suspensión bacteriana en matraces que contenían caldo Mueller-Hinton suplementado con cationes (Difco), y se incubó a 35° C hasta alcanzar una concentración bacteriana final aproximada de $1\text{-}5 \cdot 10^7$ UFC/ml ($\lambda=580$, Absorbancia=0,085).

El rango de concentraciones de cefepima estudiadas se basó en los valores de CMI obtenidos en el apartado “III.3”, y comprendió: 0,125xCMI, 0,25xCMI, 0,5xCMI, 1xCMI, 2xCMI, 4xCMI, 8xCMI y 16xCMI. Las placas de agar Mueller-Hinton suplementadas con 5% de sangre

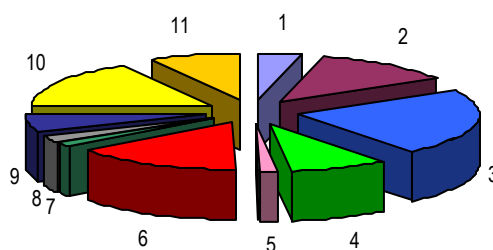
de carnero que contenían las concentraciones seriadas de cada antibiótico estudiado, fueron preparadas el día anterior a su inoculación y mantenidas a 4° C; como control, se emplearon placas sin antibiótico. A lo largo de 72 horas de incubación a 35° C se hizo un seguimiento (recuento) de las colonias crecidas (24, 48 y 72 horas), para tomar como definitivo el valor observado al último tiempo de lectura. Los cambios en las PAPs (análisis del perfil poblacional) fueron caracterizadas mediante la representación gráfica del recuento de viables (\log_{10} UFC/ml) frente a la concentración de antimicrobiano de las placas (entre 0 y 16xCMI) y calculando el área bajo la curva de PAP (ABC-PAP) mediante la regla trapezoidal (método logarítmico-lineal para las infusiones y método lineal para la administración *in bolus*). Las diferencias entre las ABC-PAPs correspondientes a los aislados pre-tratamiento (nº aislado pre-tto) y tras el tratamiento con cefepima 2000mg/8h cefepima IV 2000mg + amoxicilina-ácido clavulánico IV 1000/200mg cada 8 horas (nº aislado IV), y con cefepima en infusión continua 4000 mg + amoxicilina-ácido clavulánico IV 1000/200mg cada 8 horas (nº aislado IC), se analizaron empleando el análisis de la varianza (ANOVA) con posterior test de Turkey ; se considerará estadísticamente significativa una $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)

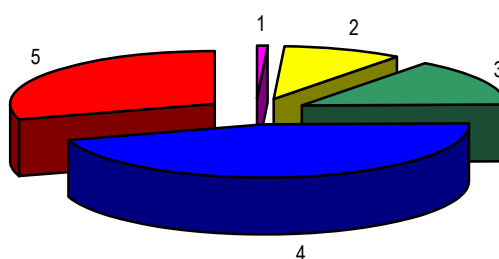
En el periodo comprendido entre los años 1999-2002 fueron recogidos 125 aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* en diversos hospitales del territorio nacional, cuya procedencia biológica y geográfica se distribuyó tal y como se presenta en la figura 5:

Procedencia geográfica



- | | |
|---|---|
| 1- Hosp. Puerta de Hierro (Madrid): 4% | 7- Hosp. Provincial Alcázar de San Juan (Ciudad Real): 1,6% |
| 2- Hosp. Gregorio Marañón (Madrid): 12,8% | 8- Clínica Moncloa: 2,4% |
| 3- Hosp. Nacional de Paraplégicos (Toledo): 22,4% | 9- Hosp. Universitario de Zaragoza: 6,4% |
| 4- Hosp. Severo Ochoa (Madrid): 8,8% | 10- Hosp. Clínico Universitario de Salamanca: 16,8% |
| 5- Hosp. Ramón y Cajal (Madrid): 1,6% | 11- Otros (centros únicos): 8% |
| 6- Hosp. Clínico San Carlos: 15,2% | |

Fuentes biológicas



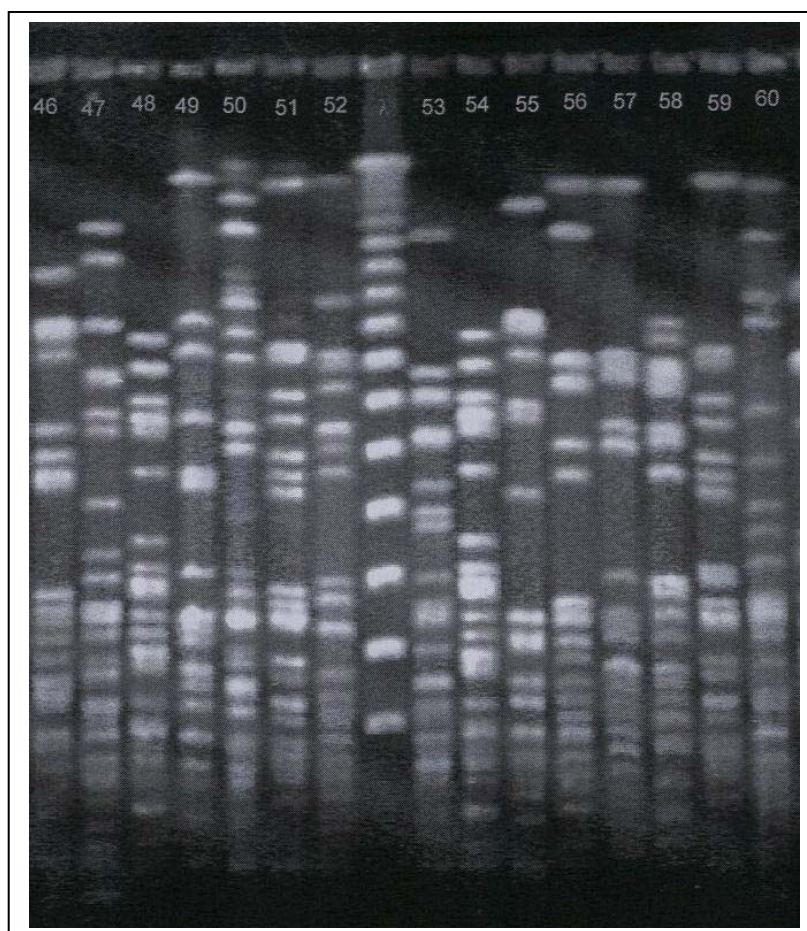
- | | |
|---------------------------|----------------------------------|
| 1- Origen ambiental: 0,8% | 4- Muestras respiratorias: 45,6% |
| 2- Exudados: 9,6% | 5- Orina: 29,6% |
| 3- Hemocultivos: 14,4% | |

De la colección de 125 aislados clínicos fue eliminado el número 97 (muestra de orina procedente del Hospital de Paraplégicos de Toledo) al no obtener confirmación positiva de la

identidad del microorganismo como *S. maltophilia* tras realizar la identificación bioquímica con API-20NE. Los restantes 124 aislados clínicos, confirmados como *S. maltophilia* mediante el sistema API-20NE, fueron analizados por medio de la técnica de PFGE empleando la endonucleasa *Xba*I para la digestión del ADN cromosómico total.

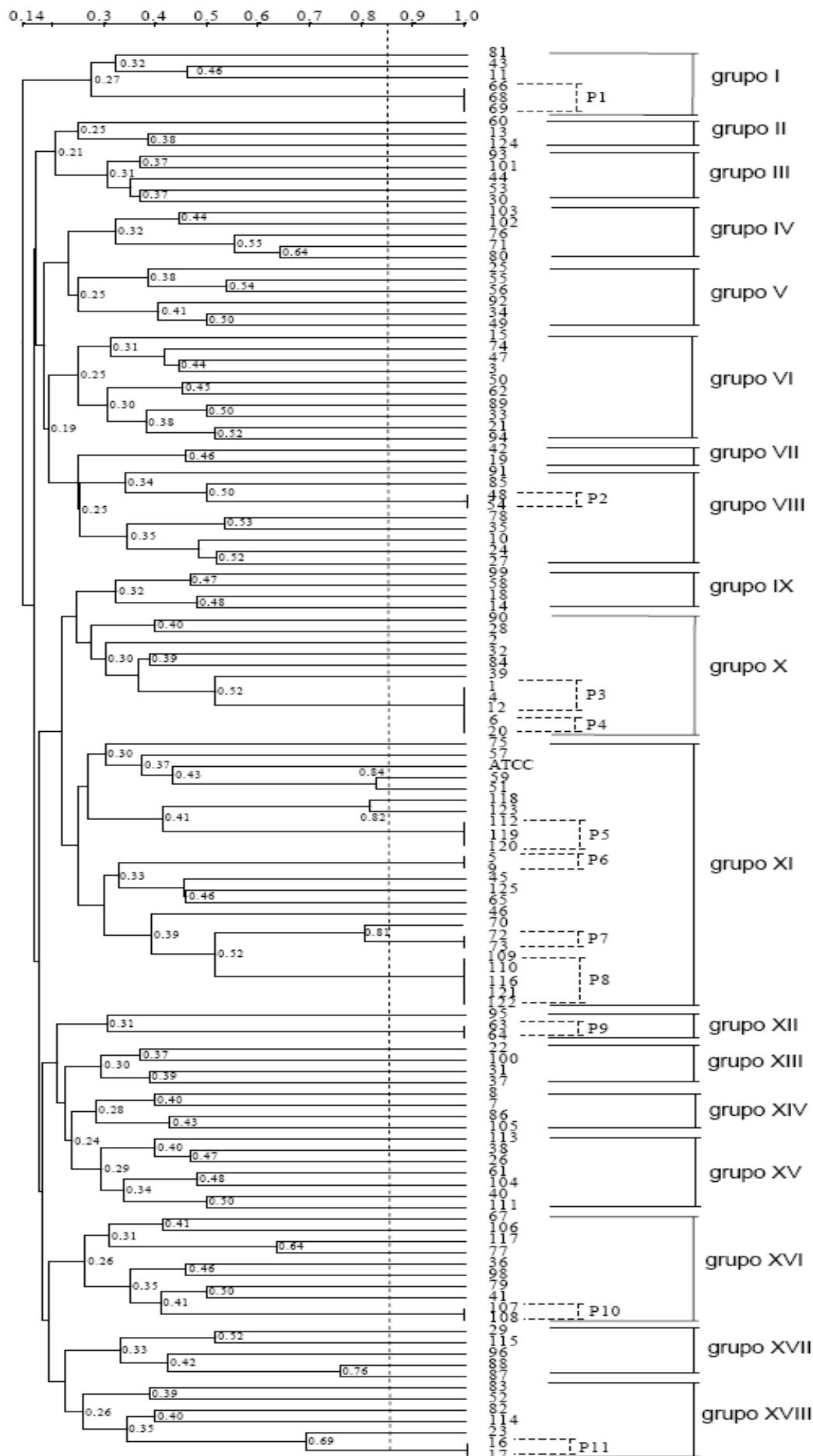
En la figura 6 se muestra la resolución obtenida mediante PFGE para el análisis de los distintos perfiles obtenidos en una selección de cepas.

Figura 6: Algunos de los perfiles obtenidos tras digestión con *Xba*I, en la parte superior se identifica el aislado clínico/patrón “λ”.



El análisis comparativo de los perfiles de bandas mostrados por la totalidad de los pulsotipos fue utilizado para trazar el árbol o dendograma de similitud genética de Dice, represen-

Figura 7: Dendrograma de similitud genética entre los 106 pulsotipos generados por *Xba*I en las 124 cepas de *S. maltophilia* (se incluye la cepa de referencia *S. maltophilia* ATCC 13637)



tado en la figura 7. Atendiendo a los perfiles obtenidos, considerando el punto de corte de identidad en 85% de similitud y de acuerdo con los criterios establecidos por Tenover y cols. ⁽¹⁰⁰⁾, se identificaron 106 pulsotipos diferentes (ver figura 7).

El índice de discriminación de Simpson, que mide la probabilidad de que dos cepas genéticamente no relacionadas se incluyan en distinto perfil, alcanzó un valor de 0,989. De acuerdo con el dendograma obtenido, el índice de similitud de las cepas obtenido varió entre 0,14 y 1; por otra parte, considerando los pulsotipos obtenidos, el índice de similitud entre los diferentes perfiles genéticos osciló entre 0,14 y 0,84. A este respecto, y de acuerdo con la tabla 7 (ver tabla 7) y el dendograma anteriormente referido, las cepas con índice de similitud 1 poseen un origen común y, por tanto, se pueden considerar la misma cepa.

En el dendograma representado en la figura 7 se identificaron, según el nivel de significación, grupos discretos, variables en función de dicho nivel de significación. Así, con un nivel de significación del 25% se pudieron establecer 18 grupos que comprendieron diferente número de pulsotipos:

Grupo I: Incluyó 4 perfiles de PFGE distintos, entre los que se distribuían 6 cepas (4,84%), con unos coeficientes de similitud genética entre pulsotipos (expresados en porcentaje) que oscilaron entre un 27% y un 46%. Al establecerse un nivel de significación mayor (35%), se diferenciaron 3 subgrupos:

Sugrupo Ia: pulsotipo único, 1 cepa (0,81%).

Sugrupo Ib: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo Ic: 1 pulsotipo, 3 cepas (2,42%).

Grupo II: Incluyó 3 perfiles de PFGE distintos, correspondientes a 3 cepas (2,42%), con un nivel de similitud genética de un 25% y un 38%. Con un nivel de significación del 35% se diferenciaron 2 subgrupos:

Sugrupo IIa: pulsotipo único, 1 cepa (0,81%).

Tabla 7: Adscripción a origen y pulsotipo de las 124 cepas de procedencia hospitalaria de *S. maltophilia*.

Aislado ^{a,b}	Origen clínico	Origen geográfico ^d	Perfil PFGE <i>Xba</i> I	Grupo
Sma 81	M. respiratoria ^c	Mad-RyC	1	I
Sma 43	Orina	C. Real	2	
Sma 11	Orina	Salamanca	3	
Sma (66, 68, 69) ¹	M. respiratoria	Mad-CI	4	
Sma 60	M. respiratoria	Mad-CI	5	II
Sma 13	Orina	Salamanca	6	
Sma 124	M. respiratoria	Mad-GM	7	
Sma 93	M. respiratoria	Toledo	8	III
Sma 101	Orina	Toledo	9	
Sma 44	M. respiratoria	C. Real	10	
Sma 53	M. respiratoria	Toledo	11	
Sma 30	Ambiental		12	
Sma 103	M. respiratoria	Toledo	13	IV
Sma 102	M. respiratoria	Toledo	14	
Sma 76	M. respiratoria	Mad-CI	15	
Sma 71	M. respiratoria	Mad-CI	16	
Sma 80	M. respiratoria	Mad-RyC	17	
Sma 25	Orina	Sevilla	18	V
Sma 55	M. respiratoria	Toledo	19	
Sma 56	Orina	Toledo	20	
Sma 92	Hemocultivo	Mad-SO	21	
Sma 34	Exudado	Zaragoza	22	
Sma 49	M. respiratoria	Toledo	23	
Sma 15	Orina	Salamanca	24	

Tabla 7: (continuación).

Sma 74	M. respiratoria	Mad-CI	25	VI
Sma 47	Orina	Toledo	26	
Sma 3	Orina	Salamanca	27	
Sma 50	M. respiratoria	Toledo	28	
Sma 62	M. respiratoria	Mad-CI	29	
Sma 89	Hemocultivo	Mad-SO	30	
Sma 33	M. respiratoria	Zaragoza	31	
Sma 21	M. respiratoria	Murcia	32	
Sma 94	M. respiratoria	Toledo	33	
Sma 42	Hemocultivo	Mad-M	34	VII
Sma 9	Orina	Salamanca	35	
Sma 91	Hemocultivo	Mad-SO	36	VIII
Sma 85	Hemocultivo	Mad-SO	37	
Sma (48, 54)2	M. respiratoria	Toledo	38	
Sma 78	M. respiratoria	Mad-CI	39	
Sma 35	M. respiratoria	Zaragoza	40	
Sma 10	Orina	Salamanca	41	
Sma 24	M. respiratoria	S. Sebastian	42	
Sma 27	Hemocultivo	Barcelona	43	
Sma 99	Orina	Toledo	44	IX
Sma 58	M. respiratoria	Toledo	45	
Sma 18	Orina	Salamanca	46	
Sma 14	Orina	Salamanca	47	
Sma 90	Hemocultivo	Mad-SO	48	
Sma 28	Hemocultivo	Valencia	49	

Tabla 7: (continuación).

Sma 2	Orina	Salamanca	50	
Sma 32	Hemocultivo	Mad-M	51	
Sma 84	Hemocultivo	Mad-SO	52	X
Sma 39	Exudado	Zaragoza	53	
Sma (1, 4, 12) ³ (6, 20) ⁴	Orina	Salamanca	54	
Sma 75	M. respiratoria	Mad-CI	55	
Sma 57	Orina	Toledo	56	
Sma 59	Orina	Toledo	57	
Sma 51	M. respiratoria	Toledo	58	
Sma 118	M. respiratoria	Mad-GM	59	
Sma 123	Hemocultivo	Mad-GM	60	
Sma (112, 119, 120) ⁵	Hemocultivo	Mad-GM	61	
Sma (5, 9) ⁶	Orina	Salamanca	62	XI
Sma 45	Orina	Toledo	63	
Sma 125	Exudado	Mad-PH	64	
Sma 65	M. respiratoria	Mad-CI	65	
Sma 46	Orina	Toledo	66	
Sma 70	M. respiratoria	Mad-CI	67	
Sma (72, 73) ⁷	M. respiratoria	Mad-CI	68	
Sma (109, 116, 121) ⁸ (110, 122) ⁸	M. respiratoria Exudado	Mad-GM	69	
Sma 95	Orina	Toledo	70	
Sma (63, 64) ⁹	M. respiratoria	Mad-CI	71	XII
Sma 22	M. respiratoria	Barcelona	72	
Sma 100	M. respiratoria	Toledo	73	XIII
Sma 31	Hemocultivo	Burgos	74	

Tabla 7: (continuación).

Sma 37	M. respiratoria	Zaragoza	75	
Sma 8	Orina	Salamanca	76	
Sma 7	Orina	Salamanca	77	XIV
Sma 86	Hemocultivo	Mad-SO	78	
Sma 105	Orina	Toledo	79	
Sma 113	M. respiratoria	Mad-GM	80	
Sma 38	M. respiratoria	Zaragoza	81	
Sma 26	Exudado	Barcelona	82	
Sma 61	M. respiratoria	Mad-CI	83	XV
Sma 104	M. respiratoria	Toledo	84	
Sma 40	Exudado	Zaragoza	85	
Sma 111	Hemocultivo	Mad-GM	86	
Sma 67	M. respiratoria	Mad-CI	87	
Sma 106	M. respiratoria	Mad-PH	88	
Sma 117	M. respiratoria	Mad-GM	89	
Sma 77	M. respiratoria	Mad-CI	90	
Sma 36	M. respiratoria	Zaragoza	91	XVI
Sma 98	Orina	Toledo	92	
Sma 79	Orina	Mad-PH	93	
Sma 41	M. respiratoria	Mad-M	94	
Sma (107, 108) ¹⁰	M. respiratoria	Mad-PH	95	
Sma 29	M. respiratoria	Las Palmas	96	
Sma 115	Exudado	Mad-GM	97	XVII
Sma 88	Exudado	Mad-SO	99	
Sma 87	Exudado	Mad-SO	100	

Tabla 7: (continuación).

Sma 83	Hemocultivo	Mad-SO	101	XVIII
Sma 52	Orina	Toledo	102	
Sma 82	Orina	Mad-SO	103	
Sma 114	Exudado	Mad-GM	104	
Sma 23	Exudado	Salamanca	105	
Sma (16, 17) ¹¹	Orina	Salamanca	106	

(a) Aislados repetidos con origen clínico común, entre paréntesis; (b) pacientes con aislados repetidos, superíndice numérico; (c) muestra respiratoria; (d) origen geográfico-hospitales: H. Provincial Alcázar de San Juan (C. Real), H. Clínico San Carlos-Madrid (Mad-CI), H. Gregorio Marañón-Madrid (Mad-GM), Clínica Moncloa-Madrid (Mad-M), H. Puerta de Hierro-Madrid (Mad-PH), H. Ramón y Cajal-Madrid (Mad-RyC), H. Severo Ochoa-Madrid (Mad-SO), H. Universitario de Salamanca (Salamanca), H. Nacional de Paraplégicos (Toledo), H. Universitario de Zaragoza (Zaragoza); centros universitarios desde los que se recibió una única muestra: Barcelona, Burgos, Las Palmas, Murcia, S. Sebastián, Sevilla, Valencia.

Sugrupo IIb: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Grupo III: Incluyó 5 perfiles de PFGE distintos, que correspondían a 5 cepas (4,03%), mostrando un nivel de similitud genética entre un 31% - 37%. Un nivel de significación del 35% permitió diferenciar 2 subgrupos:

Sugrupo IIIa: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo IIIb: 3 pulsotipos, 3 cepas (2,42%).

Grupo IV: Incluyó 5 perfiles de PFGE distintos, que correspondían a 5 cepas (4,03%), mostrando valores de similitud genética que oscilaron entre un 32% - 64%. Al considerar un nivel de similitud del 35% se distinguieron 2 subgrupos:

Sugrupo IVa: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo IVb: 3 pulsotipos, 3 cepas (2,42%).

Grupo V: Incluyó 6 perfiles de PFGE distintos, correspondientes a 6 cepas (4,84%), con unos coeficientes de similitud genética que oscilaron entre un 25% y un 54%. Con un nivel de significación del 35% se diferenciaron 2 subgrupos:

Sugrupo Va: 3 pulsotipos, 3 cepas (2,42%).

Sugrupo Vb: 3 pulsotipos, 3 cepas (2,42%).

Grupo VI: Incluyó 10 perfiles de PFGE distintos, correspondientes a 10 cepas (8,06%), mostrando un nivel de similitud genética entre un 25% - 52%. Un nivel de significación del 35% permitió diferenciar 4 subgrupos:

Sugrupo VIa: pulsotipo único, 1 cepa (0,81%).

Sugrupo VIb: 3 pulsotipos, 3 cepas (2,42%).

Sugrupo VIc: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo VId: 4 pulsotipos, 4 cepas (3,22%).

Grupo VII: Incluyó 2 perfiles de PFGE distintos, correspondientes a 2 cepas (1,61%), con un índice de similitud genética de 46%. Cuando se consideró un nivel de similitud del 35% no se dividió el grupo.

Grupo VIII: Incluyó 8 perfiles de PFGE distintos, entre los que se distribuían 9 cepas (7,26%), con unos coeficientes de similitud genética que oscilaron entre un 25% y un 53%. Al establecerse un nivel de significación del 35% se diferenciaron 3 subgrupos:

Sugrupo VIIIa: pulsotipo único, 1 cepa (0,81%).

Sugrupo VIIIb: 2 pulsotipos, 3 cepas (2,42%).

Sugrupo VIIIc: 5 pulsotipos, 5 cepas (4,03%).

Grupo IX: Incluyó 4 perfiles de PFGE distintos, que correspondían a otras tantas cepas (3,23%), con unos coeficientes de similitud genética que oscilaron entre un 32% y un 48%. Un nivel de significación del 35% permitió diferenciar 2 subgrupos:

Sugrupo IXa: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo IXb: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Grupo X: Incluyó 7 perfiles de PFGE distintos, entre los que se distribuían 11 cepas (8,87%), con unos índices de similitud genética que oscilaron entre un 27% y un 52%. Al considerar un nivel de similitud del 35% se distinguieron 3 subgrupos:

Sugrupo Xa: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo Xb: pulsotipo único, 1 cepa (0,81%).

Sugrupo Xc: 4 pulsotipo, 8 cepas (6,45%).

Grupo XI: Incluyó 16 perfiles de PFGE distintos, entre los que se distribuían 23 cepas (18,55%), con unos coeficientes de similitud genética que oscilaron entre un 25% y un 84%. Al establecerse un nivel de significación mayor (35%), se diferenciaron 6 subgrupos:

Sugrupo XIa: pulsotipo único, 1 cepa (0,81%).

Sugrupo XIb: 3 pulsotipos, 3 cepas (2,42%).

Sugrupo Xlc: 3 pulsotipos, 5 cepas (4,03%).

Sugrupo Xld: 1 pulsotipo, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo Xle: 3 pulsotipos, 3 cepas (2,42%).

Sugrupo Xlf: 4 pulsotipos, 9 cepas (7,26%)

Grupo XII: Incluyó 2 perfiles de PFGE distintos, entre los que se distribuían 3 cepas (2,42%), con un índice de similitud genética de 31%. Con un nivel de significación del 35% se diferenciaron 2 subgrupos:

Sugrupo XIIa: pulsotipo único, 1 cepa (0,81%).

Sugrupo XIIb: 1 pulsotipo, 2 cepas (1,61%).

Grupo XIII: Incluyó 4 perfiles de PFGE distintos, correspondientes a otras tantas cepas (3,23%), con unos coeficientes de similitud genética que oscilaron entre un 30% y un 39%. Al considerar un nivel de significación de 35% se diferenciaron 2 subgrupos:

Sugrupo XIIIa: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo XIIIb: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Grupo XIV: Incluyó 4 perfiles de PFGE distintos, que correspondían a 4 cepas (3,23%), con unos coeficientes de similitud genética que oscilaron entre un 28% y un 43%. Considerando un nivel de significación de 35% el grupo se dividió en 2 subgrupos:

Sugrupo XIVa: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo XIVb: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Grupo XV: Incluyó 7 perfiles de PFGE distintos, que correspondieron a otras tantas cepas (5,64%), con unos coeficientes de similitud genética que oscilaron entre un 29% y un 50%. Con un nivel de significación del 35% se diferenciaron 3 subgrupos:

Sugrupo XVa: 3 pulsotipos, 3 cepas (2,42%).

Sugrupo XVb: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo XVc: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Grupo XVI: Incluyó 9 perfiles de PFGE distintos, entre los que se distribuían 10 cepas (8,06%), con unos coeficientes de similitud genética que oscilaron entre un 26% y un 64%.

Cuando se consideró un nivel de significación de 35% se diferenciaron 3 subgrupos:

Sugrupo XVIa: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo XVIb: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo XVIc: 5 pulsotipo, 6 cepas (4,84%).

Grupo XVII: Incluyó 5 perfiles de PFGE distintos, que correspondían a 5 cepas (4,03%), con unos coeficientes de similitud genética que oscilaron entre un 33% y un 76%. Un nivel de significación del 35% permitió diferenciar 2 subgrupos:

Sugrupo XVIIa: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo XVIIb: 3 pulsotipos, 3 cepas (2,42%).

Grupo XVIII: Incluyó 6 perfiles de PFGE distintos, entre los que se distribuían 7 cepas (5,64%), con unos índices de similitud genética que oscilaron entre un 26% y un 69%. Al establecerse un nivel de significación de 35% se diferenciaron 2 subgrupos:

Sugrupo XVIIIa: 2 pulsotipos, 2 cepas (1,61%).

Sugrupo XVIIIb: 4 pulsotipos, 5 cepas (4,03%).

El análisis del citado dendograma mostró una gran diversidad genética; así, los 106 pulsotipos obtenidos entre los 124 aislamientos clínicos recogidos determinaron un coeficiente de heterogeneidad genómica entre las cepas de *S. maltophilia* de un 85,48%.

4.2. PERFIL DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad realizadas frente a los diferentes grupos de antimicrobianos (CMI₅₀, CMI₉₀, %I, %R y %S), para los 106 pulsotipos únicos, se exponen a continuación; en todos los casos la incubación se realizó en condiciones de

Tabla 8: Actividad in vitro de aminoglucósidos frente a 106 aislamientos de *S. maltophilia* con diferente perfil electroforético.

Antimicrobianos	24 horas						48 horas					
	Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)			Rango (mg/l)	CMI mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)		
		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R
Amikacina	1-256	256	>256	4,72	3,77	91,51	1-256	256	>256	4,72	3,77	91,51
Gentamicina	2-256	128	>256	7,55	6,60	85,85	2-256	128	>256	6,60	3,77	89,62
Tobramicina	1->512	32	>512	6,60	8,49	84,91	1->512	32	>512	6,60	8,49	84,91

Tabla 9: Actividad in vitro de betalactámicos frente a 106 aislamientos de *S. maltophilia* con diferente perfil electroforético.

Antimicrobianos	24 horas						48 horas					
	Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)			Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)		
		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R
Aztreonam	4->256	>256	>256	3,77	0,00	96,23	4->256	>256	>256	1,89	1,89	96,23
Aztr/clav (0,5)	2->256	256	>256	9,43	5,66	84,91	2->256	>256	>256	7,55	3,77	88,68
Aztr/clav (1)	0,5->256	64	>256	26,42	6,60	66,98	0,5->256	128	>256	24,53	7,55	67,92
Aztr/clav (2)	1->256	8	>256	52,83	6,60	40,57	2->256	16	>256	36,79	17,92	45,28
Aztr/clav (2:1)	2-32	8	16	64,15	26,42	9,43	4-64	8	16	51,89	38,68	9,43
Ceftazidima	2->256	64	256	22,64	5,66	71,70	2->256	64	>256	19,81	5,66	74,53

Cefta/clav (0,5)	0,5->256	64	256	25,47	10,38	64,15	0,5->256	64	256	23,58	11,32	65,09
Cefta/clav (1)	1->256	64	256	24,53	4,72	70,75	2->256	64	256	21,70	6,60	71,70
Cefta/clav (2)	1->256	32	256	26,42	4,72	68,87	1->256	32	256	24,53	6,60	68,87
Cefta/sulb (4)	2->256	64	256	21,70	7,55	70,75	2->256	64	256	21,70	6,60	71,70
Cefta/tazo (8)	1->256	64	256	21,70	4,72	73,58	2->256	64	256	20,75	5,66	73,58
Cefepima	1->256	32	128	7,55	15,09	77,36	2->256	64	128	6,60	9,43	83,96
Cep/clav (0,5)	1->256	32	64	29,25	12,26	58,49	2->256	32	64	24,53	9,43	66,04
Cep/clav (1)	2->256	16	64	48,11	25,47	26,42	2->256	16	64	33,96	24,53	41,51
Cep/clav (2)	1->256	8	32	63,21	24,53	12,26	1->256	8	32	52,83	26,42	20,75
Cep/sulb (4)	1->256	32	64	11,32	20,75	67,92	2->256	32	64	8,49	15,09	76,42
Cep/tazo (8)	2->256	16	64	34,91	28,30	36,79	2->256	16	64	27,36	27,36	45,28
Imipenem	64->256	>256	>256	0,00	0,00	100,00	64->256	>256	>256	0,00	0,00	100,00
Meropenem	2->256	128	>256	3,77	2,83	93,40	2->256	128	>256	2,83	0,94	96,23
Piperacilina	4->256	>256	>256	1,89	7,55	90,57	16->256	>256	>256	1,89	2,83	95,28
Piper/tazo(4)	8->256	256	>256	4,72	8,49	86,79	8->256	>256	>256	0,94	7,55	91,51
Ticarcilina	4->256	256	>256	5,66	8,49	85,85	4->256	256	>256	5,66	2,83	91,51
Ticar/clav (0,5)	4->256	128	>256	29,25	16,98	53,77	4->256	128	>256	23,58	18,87	57,55
Ticar/clav (1)	1->256	32	256	42,45	21,70	35,85	1->256	64	>256	34,91	18,87	46,23
Ticar/clav (2)	4->256	32	128	41,51	32,08	26,42	4->256	32	256	32,08	33,02	34,91
Ticar/sulb (4)	2->256	256	>256	9,43	13,21	77,36	2->256	256	>256	7,55	9,43	83,02

Tabla 9: Actividad in vitro de betalactámicos frente a 106 aislamientos de *S. maltophilia* con diferente perfil electroforético (CONTINUACIÓN)

Tabla 11: Actividad in vitro de quinolonas frente a 106 aislamientos de *S. maltophilia* con diferente perfil electroforético.

Antimicrobianos	24 horas						48 horas					
	Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)			Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)		
		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R
Ácido nalidíxico	2-512	16	64	68,87	0,00	31,13	2-512	16	128	51,89	0,00	48,11
Ciprofloxacino	0,25-128	2	16	19,81	36,79	43,40	0,25-128	4	16	12,26	32,08	55,66
Clinafloxacino	0,015-4	0,25	1	94,34	4,72	0,94	0,03-4	0,25	1	93,40	3,77	2,83
Gatifloxacino	0,06-64	1	8	81,13	7,55	11,32	0,06-64	2	8	78,30	10,38	11,32
Gemifloxacino	0,125-256	1	4	66,98	18,87	14,15	0,125-256	2	8	44,34	28,30	27,36
Levofloxacino	0,125-64	1	4	76,42	14,15	9,43	0,125-64	2	8	72,64	16,98	10,38
Moxifloxacino	0,03-32	0,5	2	90,57	0,00	9,43	0,03-32	1	4	87,74	0,00	12,26
Norfloxacino	1-512	16	64	2,83	17,92	79,25	1->512	16	64	2,83	13,21	83,96
Ofloxacino	0,25-128	2	16	53,77	19,81	26,42	0,25-128	4	16	40,57	30,19	29,25
Trovafloracino	0,03-64	1	4	84,91	0,00	15,09	0,03-64	2	4	71,70	0,00	28,30

Tabla 12: Actividad in vitro de macrólidos frente a 106 aislamientos de *S. maltophilia* con diferente perfil electroforético.

Antimicrobianos	24 horas						48 horas					
	Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)			Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)		
		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R
Azitromicina	8-256	64	128	-	-	-	8-256	64	128	-	-	-
Claritromicina	16-512	128	256	-	-	-	16-512	128	256	-	-	-
Eritromicina	16-512	128	256	-	-	-	16-1024	256	512	-	-	-

Tabla 13: Actividad in vitro de tetraciclinas frente a 106 aislamientos de *S. maltophilia* con diferente perfil electroforético.

Antimicrobianos	24 horas						48 horas					
	Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)			Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)		
		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R
Doxiciclina	0,125-8	2	4	90,57	9,43	0,00	0,25-8	4	8	78,30	21,70	0,00
Minociclina	0,25-16	4	8	69,81	26,42	3,77	0,5-16	8	16	46,23	41,51	12,26
Tetraciclina	2-32	16	32	2,83	14,15	83,02	4-64	32	32	0,94	1,89	97,17
Tigeciclina	<0,25-4	0,5	2	91,50	8,50	0,00	<0,25-4	1	2	91,50	8,50	0,00

Tabla 14: Actividad in vitro de otros antimicrobianos frente a 106 aislamientos de *S. maltophilia* con diferente perfil electroforético.

Antimicrobianos	24 horas						48 horas					
	Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)			Rango (mg/l)	CMI (mg/l)		Sensibilidad (% cepas totales)		
		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R		CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S	%I	%R
Cloranfenicol	8-128	16	32	18,87	53,77	27,36	8-128	32	64	7,55	37,74	54,72
Colistina	0,25-256	32	128	9,43	7,55	83,02	0,25-256	32	128	9,43	2,83	87,74
Cotrimoxazol	0,25-128	2	64	71,70	0,00	28,30	0,25-256	2	128	66,98	0,00	33,02
Fosfomicina	64-256	128	256	0,00	20,75	79,25	64-512	128	256	0,00	2,83	97,17
Linezolid	128-256	256	256	-	-	-	128-256	256	256	-	-	-
Polimixina B	0,5-128	32	128	7,55	3,77	88,68	0,5-256	32	128	7,55	2,83	89,62
Rifampicina	0,5-64	8	16	2,83	14,15	83,02	1-128	8	32	0,94	5,66	93,40

aerobiosis a 35° C, diferenciando el tiempo de lectura (24-48 horas) al que corresponden los distintos valores.

En base al dendograma obtenido en el apartado anterior, para la realización del nuevo proyecto entre los grupos de aislados que presentaron un mismo pulsotipo se seleccionaron los siguientes aislados: 69, 48, 1, 120, 9, 72, 109 (muestra respiratoria), 63, 107 y 16.

· 4.2.1. Perfil de sensibilidad a aminoglucósidos

Tal y como refleja la tabla 8, los aminoglucósidos mostraron una actividad reducida frente a los aislamientos de *S. maltophilia* con porcentajes de sensibilidad inferiores al 10%. La amikacina resultó ser el aminoglucósido menos activo al presentar el menor porcentaje de cepas inhibidas (91,51% cepas resistentes), mientras que la tobramicina se mostró como el más eficaz con el menor porcentaje de cepas resistentes (84,91%). Las diferencias observadas en el porcentaje de cepas resistentes en el caso de gentamicina, en función de los tiempos de lectura, no han resultado ser estadísticamente significativas ($p > 0,05$ test Chi-cuadrado).

· 4.2.2. Perfil de sensibilidad a betalactámicos

En la tabla 9 se muestran los resultados correspondientes a los betalactámicos, y sus combinaciones con inhibidores de betalactamasas, estudiados en 106 aislamientos de *S. maltophilia* con pulsotipo único.

En ausencia de inhibidor de betalactamasas, a las 24 horas de incubación ceftazidima se comportó como el betalactámico más activo con un porcentaje de resistencia de 71,70%, frente al 77,36%, 85,85%, 90,57%, 93,40%, 96,23% y 100% correspondientes a cefepima, ticarcilina, piperacilina, meropenem, aztreonam e imipenem, respectivamente. A las 48 horas de incubación se apreció un leve aumento generalizado en el porcentaje de resistencia en detrimento,

principalmente, de los porcentajes de cepas sensibles; de cualquier forma, ceftazidima, cefepima y ticarcilina se mantuvieron como los más activos.

En general, en la tabla 9 se puede observar una mejora de la actividad de los betalactámicos al ser combinados con inhibidores de betalactamasas, que se tradujo en una reducción del porcentaje de aislados resistentes. Los inhibidores de betalactamasas testados fueron ácido clavulánico (0,5, 1 y 2 mg/l), sulbactam (4 mg/l) y tazobactam (8 mg/l). La comparación de resultados obtenidos al combinar estos inhibidores con ceftazidima, cefepima y ticarcilina reveló que la combinación con ácido clavulánico resultó ser la más eficaz, seguida de tazobactam y, por último, sulbactam. En el caso de ceftazidima, la combinación con los diferentes inhibidores de betalactamasas determinó leves reducciones en el porcentaje de cepas resistentes que no resultaron ser estadísticamente significativas ($p > 0,05$ test Chi-cuadrado) a ambos tiempos de lectura. Por otra parte, la combinación de cefepima o ticarcilina con ácido clavulánico o sulbactam supuso un aumento altamente significativo ($p < 0,0001$ test Chi-cuadrado; sólo la combinación de cefepima-ácido clavulánico 0,5 mg/l presentó valores superiores: $p = 0,0033$ y $p = 0,0026$ a las 24 y 48 horas, respectivamente) en la sensibilidad de las cepas testadas a ambos tiempos de lectura. En el caso de cefepima y ticarcilina la máxima reducción en el porcentaje de cepas resistentes se detectó al combinarlos con ácido clavulánico 2 mg/l (cefepima-ácido clavulánico 2 mg/l.: 12,26% y 20,75% a las 24 y 48 horas, respectivamente; ticarcilina-ácido clavulánico 2 mg/l.: 26,42% y 34,91% a las 24 y 48 horas, respectivamente) observándose descensos en dicho porcentaje de 65,1% a las 24 horas, y 63,21% a las 48 horas, para la combinación de cefepima, y 59,43% a las 24 horas, y 56,6% a las 48 horas, para la combinación de ticarcilina, respecto a los resultados obtenidos con estos compuestos en ausencia de inhibidor de betalactamasas.

Otras combinaciones betalactámico-inhibidor de betalactamasas testadas fueron piperacilina-tazobactam (4 mg/l) y aztreonam en combinación con diferentes concentraciones

(0,5, 1 y 2 mg/l) de ácido clavulánico. Para la primera combinación, la adición de tazobactam supuso un aumento en la sensibilidad de los aislados a piperacilina, si bien dicho aumento no resultó ser estadísticamente significativo ($p > 0,05$ test Chi-cuadrado). En el caso de aztreonam, la escasa sensibilidad de los aislados a este compuesto se vio incrementada de forma evidente al añadir ácido clavulánico, siendo la combinación de aztreonam con ácido clavulánico en proporción 2:1 la más eficaz detectándose reducciones altamente significativas ($p < 0,0001$ test Chi-cuadrado) en el porcentaje de aislados resistentes: 86,8% a ambos tiempos de lectura.

En cuanto a los resultados obtenidos a las 24 y 48 horas de incubación, en general se observaron leves aumentos (no superiores a una dilución) en la CMI_{50} de algunos antimicrobianos/combinaciones (aztreonam combinado con 0,5, 1 y 2 mg/l de ácido clavulánico; cefepima y ticarcilina combinada con 1 mg/l de ácido clavulánico). Salvo para la combinación cefepima-ácido clavulánico (1 mg/l) ($p = 0,0203$), en ninguno de los casos las diferencias observadas en el porcentaje de cepas resistentes resultaron ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$ test Chi-cuadrado).

- 4.2.2.1. Sinergismo

A la vista de los resultados presentados, destaca la actividad que presentaron las combinaciones de aztreonam, cefepima y ticarcilina con ácido clavulánico, como inhibidor de betalactamasas. La tabla 10 resume los resultados correspondientes al efecto sinérgico (disminución de al menos 2 diluciones en la sensibilidad) de estas combinaciones observado a las 24 horas sobre el total de los 124 aislados identificados como *S. maltophilia*.

Las combinaciones que presentaron mayor actividad fueron aztreonam-ácido clavulánico (proporción 2:1), cefepima-ácido clavulánico (2 mg/l) y ticarcilina-ácido clavulánico (2 mg/l), detectándose en todos los casos sinergismo en más del 69% de las cepas estudiadas. Destaca el elevado sinergismo observado correspondiente a la combinación de aztreonam-ácido clavulánico (proporción 2:1), un 96,2% de los casos. En general, la combinación de cualquiera de

estos betalactámicos con una concentración de 2 mg/l de ácido clavulánico incrementó significativamente la actividad de éstos (sinergismo en más del 68% de los aislados), siendo la combinación de cefepima con esta concentración concreta de inhibidor de betalactamasas la que ofreció el mejor porcentaje de sinergismo: 73,6%.

Tabla 10: Número de aislados (y su correspondiente porcentaje) en los que se observó efecto sinérgico al combinar aztreonam (AZT/C), cefepima (C/C) o ticarcilina (T/C) con diferentes concentraciones de ácido clavulánico: 0,5 mg/l (0,5); 1 mg/l (1)), 2 mg/l (2) o en proporción 2:1 (2:1).

	C/C (0,5)	C/C (1)	C/C (2)	
Nº de aislados	22	55	78	
	20,8%	51,9%	73,6	
	T/C (0,5)	T/C (1)	T/C (2)	
Nº de aislados	46	60	70	
	43,4%	56,6%	69,8%	
	AZT/C (0,5)	AZT/C (1)	AZT/C (2)	AZT/C (2:1)
Nº de aislados	28	65	73	102
	26,4%	61,3%	68,9%	96,2%

No se apreció antagonismo entre los betalactámicos y los inhibidores de betalactamasas en ninguna de las combinaciones testadas.

· 4.2.3. Perfil de sensibilidad a quinolonas

En la tabla 11 se muestran los resultados correspondientes a las quinolonas estudiadas en 106 aislamientos de *S. maltophilia* con pulsotipo único, donde se aprecia una mejora en la actividad de las nuevas quinolonas frente al microorganismo respecto a las anteriores. Clinafloxacinó demostró ser el compuesto más activo con un porcentaje de resistencia del 0,94% y 2,83% a las 24 horas y 48 horas de incubación, respectivamente. A las 24 horas de incubación

levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin presentaron porcentajes de resistencia inferiores al 12%; estos valores se mantuvieron por debajo de dicho porcentaje al aumentar en 24 horas adicionales el tiempo de incubaci3n, excepto en el caso de moxifloxacin cuyo aumento a 12,26% de cepas resistentes no result3 estadisticamente significativo. Cabe destacar el hecho de que para 3cido nalidixico, gemifloxacin y trovafloxacin los porcentajes de cepas resistentes (31,13%, 14,15% y 15,09%, respectivamente) aumentaron significativamente (test Chi-cuadrado, 3cido nalidixico: $p=0,0115$; gemifloxacin: $p=0,0177$; trovafloxacin: $p=0,0197$) al incrementar hasta las 48 horas el tiempo de incubaci3n (48,11%, 27,36% y 28,03%, respectivamente). Norfloxacin demostr3 ser el compuesto menos activo con unos porcentajes de resistencia del 79,25% y 83,96% a las 24 horas y 48 horas, respectivamente, no resultando este incremento estadisticamente significativo.

• 4.2.4. Perfil de sensibilidad a macr3licos

A pesar de la ausencia de puntos de corte de referencia para valorar la actividad de los macr3licos frente a *Stenotrophomonas maltophilia*, en funci3n de la CMI₉₀ obtenida para estos antimicrobianos se pudo comprobar una baja actividad de los mismos frente al microorganismo objeto de estudio dado que para los macr3licos testados la CMI₉₀ fue de al menos 128 mg/l a ambos tiempos de lectura (ver tabla 12). Azitromicina destac3 dentro de este grupo por presentar el valor de CMI₉₀ m3s bajo (128 mg/l) a ambos tiempos de lectura, valor superado por claritromicina y eritromicina (256 mg/l, a ambos tiempos de lectura, y 256 mg/l a las 24 horas y 512 mg/l a las 48 horas, respectivamente).

• 4.2.5. Perfil de sensibilidad a tetraciclinas

En este caso, tigeciclina (glicilcyclina) y doxiciclina mostraron la mayor actividad al inhibir los 106 aislamientos de *S. maltophilia* (ver tabla 13), con un porcentaje de cepas sensibles a las

24 horas del 91,50% y 90,57%, respectivamente. Los valores de resistencia a las 24 horas de incubación de minociclina y tetraciclina, fueron 3,77% y 83,02%, respectivamente. En cuanto a los resultados observados al incrementar en 24 horas la incubación (48 horas totales), excepto en el caso de tigeciclina que se mantiene invariable, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$ test Chi-cuadrado) en los porcentajes de resistencia de minociclina ($p = 0,0228$) y tetraciclina ($p = 0,0025$). En el caso de doxiciclina, pese a no observarse incremento en el porcentaje de cepas resistentes, si es destacable el significativo incremento del porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia ($p = 0,0138$) al incrementar a 48 horas el tiempo de lectura.

· 4.2.6. Perfil de sensibilidad a otros antimicrobianos

De los resultados presentados en la tabla 14, a las 24 horas de lectura el mayor porcentaje de cepas sensibles (71,70%) correspondió a trimetoprim/sulfametoxazol o cotrimoxazol, mientras que fosfomicina, con un 0,00%, presentó el menor porcentaje. A las 24 horas de lectura los porcentajes de resistencia, en orden creciente, para cloranfenicol, cotrimoxazol, fosfomicina, colistina, rifampicina y polimixina B son 27,36%, 28,30%, 79,25%, 83,02%, 83,02% y 88,68%, respectivamente. Cabe destacar el aumento generalizado de los porcentajes de resistencia al aumentar a 48 horas el tiempo de lectura, apreciándose diferencias estadísticamente significativas (test Chi-cuadrado) entre los resultados observados a las 24 y 48 horas para fosfomicina y cloranfenicol ($p < 0,0001$), así como para rifampicina ($p = 0,0192$).

· 4.2.7. Variación en el perfil de sensibilidad de *S. maltophilia* considerando aislamientos únicos frente a aislamientos repetidos

Con el fin de valorar posibles distorsiones en el perfil de sensibilidad a antimicrobianos, y tal y como muestra la tabla 15, se compararon los resultados de sensibilidad obtenidos al

estudiar los pulsotipos únicos frente a los correspondientes al total de los aislamientos incluidos en el estudio.

De los 124 aislamientos clínicos confirmados como *S. maltophilia* 18 cepas presentaron perfiles de PFGE repetidos (ver figura 7). Considerando los puntos de corte tomados como referencia (tabla 3), los resultados de sensibilidad obtenidos a las 24 horas para las cepas con pulsotipo único varían de forma generalizada respecto a los correspondientes a la población de cepas con pulsotipos repetidos; sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$ test Chi-cuadrado). De la misma forma, al enfrentar los resultados de sensibilidad obtenidos a las 48 horas, la variación en los resultados de pulsotipos únicos respecto a cepas totales anteriormente referida se hace más acusada, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de resistencia para la combinación cefepima-clavulánico (1 mg/l), cloranfenicol, fosfomicina, rifampicina, ácido nalidíxico, gemifloxacino y trovafloxacino.

4.3. ESTUDIO DE SINERGISMO “IN VITRO”: CURVAS DE MUERTE BACTERIANA

Como queda reflejado en la sección de “Material y Métodos” (apartado III.4), tomando como referencia los resultados obtenidos por la combinación de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas en las pruebas de sensibilidad (ver apartado anterior), se realizaron estudios de muerte bacteriana para la determinación de sinergismo entre los antibióticos combinados, así como para evaluar dinámicamente el efecto de los antibióticos estudiados sobre *S. maltophilia*; dichos estudios se desarrollaron de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS ⁽¹⁰⁷⁾, y tomando como referencia los puntos de corte indicados en el apartado “III. 3. 3”. Para valorar los resultados de la combinación betalactámico-inhibidor de betalactamasas se realizó una

comparación de los mismos con los correspondientes a la actividad desarrollada por la combinación previamente descrita de cefepima-gatifloxacino.

· 4.3.1. Betalactámicos-inhibidor de betalactamasas

El estudio de letalidad desarrollado a partir de los resultados de sensibilidad obtenidos anteriormente, se realizó con doce cepas que presentaban pulsotipo único y de forma que se cubriera un amplio rango de resistencia-sensibilidad a los antibióticos betalactámicos y las combinaciones betalactámico-inhibidor de betalactamasas testadas. La tabla 16 presenta el perfil de sensibilidad de estos aislados frente a los fármacos analizados en las curvas de letalidad.

Conforme a los puntos de corte aplicados en el estudio, presentaron resistencia a cefepima las cepas 1, 2, 19, 23, 41, 43, 55, 62, 80, 88 y 120; las cepas 2 y 41 presentaron resistencia a la combinación cefepima-ácido clavulánico (2 mg/l); y frente a ticarcilina-ácido clavulánico (2 mg/l) fueron resistentes las cepas 41, 43, 55, 80 y 88. En todos los casos los resultados correspondieron a ambos tiempos de lectura; señalar que frente a la combinación cefepima- ácido clavulánico (2 mg/l) las cepas 55 y 62 presentaron sensibilidad intermedia a las 24 horas de lectura, y al aumentar en 24 horas adicionales el tiempo de lectura resultaron ser cepas resistentes, de acuerdo con los puntos de corte ya indicados.

Las concentraciones de cefepima empleadas en las curvas de muerte bacteriana alcanzaron valores de $C_{m\acute{a}x}/CMI$ que oscilaron entre los 0,12 y 10,24. La presencia de 2mg/l de ácido clavulánico incrementó el cociente, en relación al descenso en los valores de CMI que ofreció la combinación en los ensayos *in vitro*, que osciló entre los 0,48 y 81,5. Para ticarcilina-ácido clavulánico (2mg/l) los valores oscilaron entre 0,12 y 41,25.

Tabla 16: Actividad *in vitro* de cefepima (CFP), cefepima-ácido clavulánico 2mg/l (C/C 2) y ticarcilina-ácido clavulánico 2mg/l (T/C 2) frente a los aislados seleccionados para el desarrollo de las curvas de muerte bacteriana.

Cepas	CFP		C/C 2		T/C 2	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
1	32	64	4	8	8	8
2	64	128	32	64	>256	>256
19	64	128	16	16	32	32
22	16	16	2	2	32	32
23	128	128	16	16	64	64
41	64	64	32	32	256	256
43	128	128	8	8	128	256
55	64	64	16	32	256	256
62	64	128	16	32	8	16
80	64	64	16	16	128	128
88	32	32	4	8	128	128
120	32	64	8	8	64	64

La tabla 17 muestra los resultados obtenidos en las curvas de muerte bacteriana realizadas con cefepima, así como con las combinaciones de ácido clavulánico (2mg/l) con diferentes concentraciones de cefepima o ticarcilina, tras 24 horas de estudio; estos resultados quedan expresados como la media \pm desviación estándar de tres repeticiones, resaltando con un asterisco aquellas combinaciones de cefepima-ácido clavulánico que presentaron un efecto sinérgico (reducción de al menos 2 log₁₀ UFC/ml con respecto a cefepima en solitario) sobre las cepas ensayadas.

Tabla 17: Reducción en el recuento de microorganismos viables (\log_{10} UFC/ml) observada con cefepima, cefepima-ácido clavulánico (2mg/l) y ticarcilina-ácido clavulánico (2mg/l), tras 24 horas de estudio.

Cepa	Cefepima ^a				Cefepima-ác. clavulánico ^b				Ticarcilina-ác. clavulánico ^c			
	C _{máx}	75%	50%	25%	C _{máx}	75%	50%	25%	C _{máx}	75%	50%	25%
1	-2,9±0,4	-2,3±0,7	-1,9±0,9	0,0±0,9	-3,8±0,2	-3,6±0,1	-3,6±0,1	-3,5±0,2*	-2,1±1,0	-2,0±0,5	-1,5±0,4	-0,9±0,4
2	-2,3±0,6	-0,9±0,1	0,8±0,6	1,5±0,2	-3,8±0,1	-2,7±0,7	-1,0±0,3	0,6±0,1	-0,5±0,1	-0,3±0,0	-0,5±0,7	-1,0±0,2
19	-3,8±0,1	-2,7±0,1	-0,9±0,9	1,6±0,8	-3,9±0,0	-3,6±0,1	-3,4±0,1*	-2,3±0,0*	-1,3±0,2	-0,6±0,1	-0,5±0,2	-0,4±0,7
22	-4,5±0,7	-4,5±0,6	-4,1±1,0	-4,1±0,8	-5,1±0,3	-4,7±0,9	-4,7±1,0	-4,5±1,0	-2,1±1,0	-1,4±0,4	-0,8±1,0	-0,1±0,9
23	1,1±0,9	2,6±0,3	2,7±0,3	2,6±0,3	-3,1±0,9*	-3,2±0,9*	-2,5±0,7*	-1,4±0,8*	0,2±0,9	0,6±1,0	1,3±0,6	1,4±0,5
41	-2,3±0,2	-2,3±0,0	-1,8±0,3	-0,4±0,3	-3,1±0,4	-2,1±0,3	-1,9±0,4	-1,4±0,3	-0,6±0,7	0,1±0,9	1,4±0,2	1,9±0,1
43	0,4±0,2	1,8±0,1	1,9±0,2	1,9±0,1	-2,9±0,5*	-2,6±0,2*	-2,4±0,4*	-2,4±0,5*	1,9±0,3	2,2±0,1	2,2±0,3	2,3±0,4
55	-1,6±0,9	-1,0±0,8	-0,1±0,8	1,7±0,5	-3,6±0,4*	-3,6±0,4*	-2,8±1,0*	-1,8±0,3*	0,1±0,9	0,6±0,9	1,3±0,9	1,5±0,4
62	1,8±0,1	2,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0	-2,3±0,7*	-2,1±0,3*	-1,6±0,3*	-1,3±0,0*	0,0±0,0	0,2±0,0	0,4±0,0	0,7±0,0
80	1,7±0,1	2,0±0,0	2,1±0,0	2,2±0,0	-3,5±0,9*	-3,1±0,9*	-2,2±0,9*	-1,5±0,9*	-0,6±1,0	0,3±1,0	0,1±1,0	1,1±0,9
88	-2,8±0,7	-2,2±0,5	0,5±0,6	1,5±0,3	-4,1±0,5	-4,3±0,5*	-3,6±0,2*	-3,7±0,9*	-1,0±0,4	-0,7±0,4	0,2±0,3	0,2±0,2
120	-4,7±0,0	-4,7±0,0	-3,9±1,0	-2,6±0,4	-4,7±0,0	-4,6±0,0	-4,7±0,0	-4,7±0,0*	-3,6±1,0	-3,4±1,0	-3,1±1,0	-1,9±0,3

(a) C_{máx} cefepima: 163,9 mg/l ⁽¹¹⁰⁾; (b) Ácido clavulánico: 2 mg/l; (c) C_{máx} ticarcilina: 324 mg/l ⁽¹¹¹⁾

Figura 8: Actividad de cefepima (Cefep), cefepima-ácido clavulánico (2mg/l) (Cefep/clv) y ticarcilina-ácido clavulánico (2 mg/l) (Tic/clv) a diferentes concentraciones, frente a 12 aislados clínicos de *S. maltophilia*.

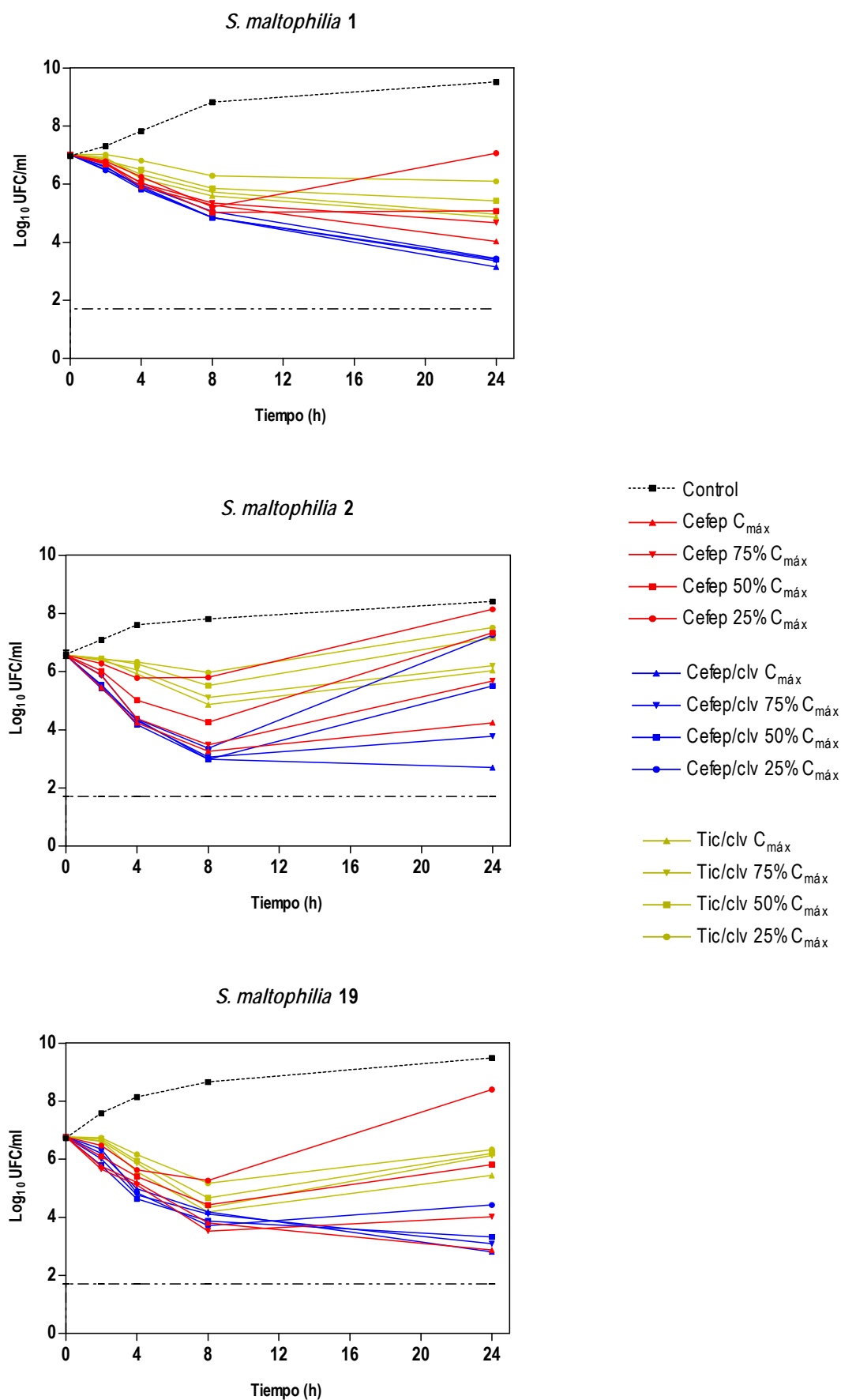


Figura 8: (continuación).

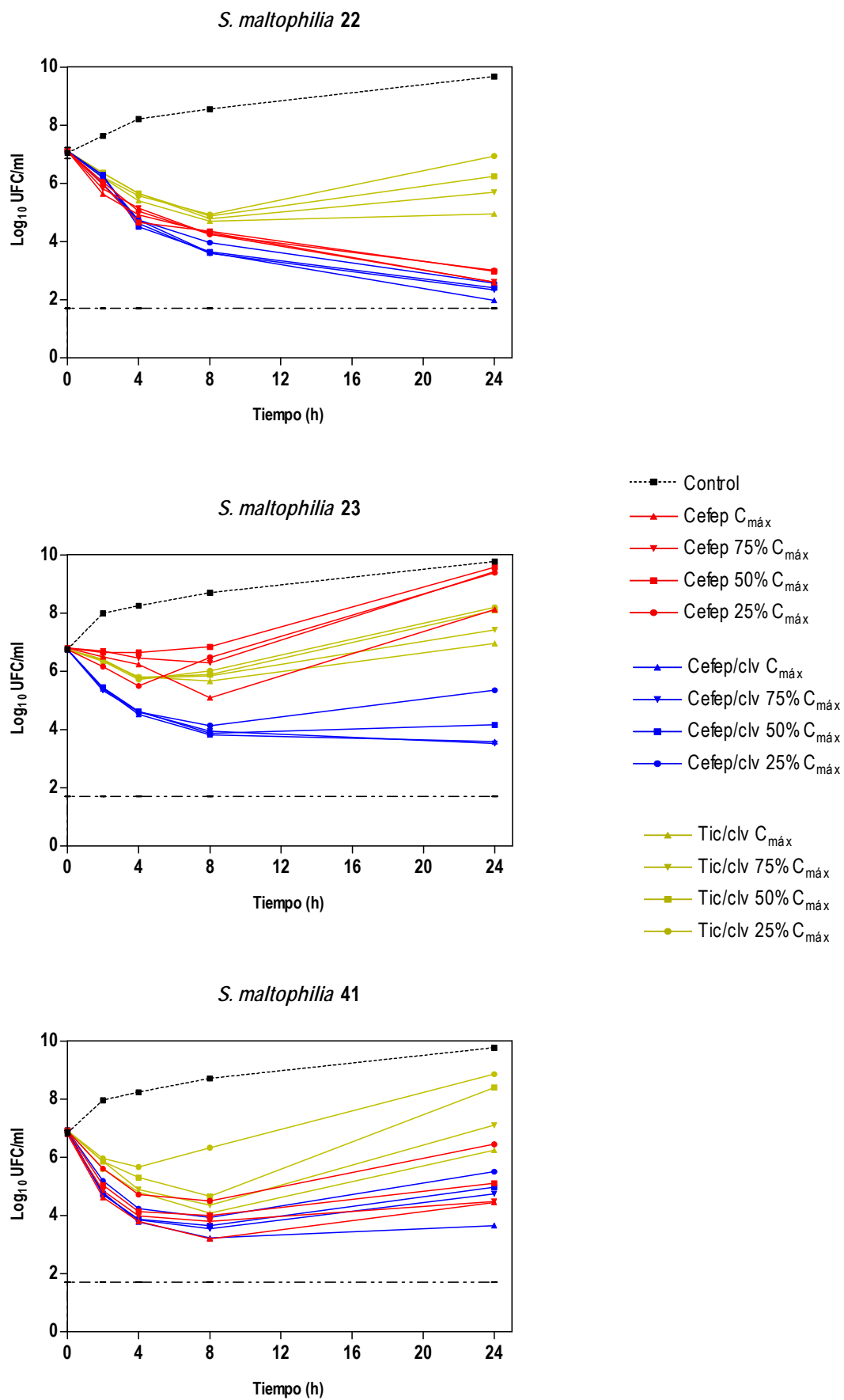


Figura 8: (continuación).

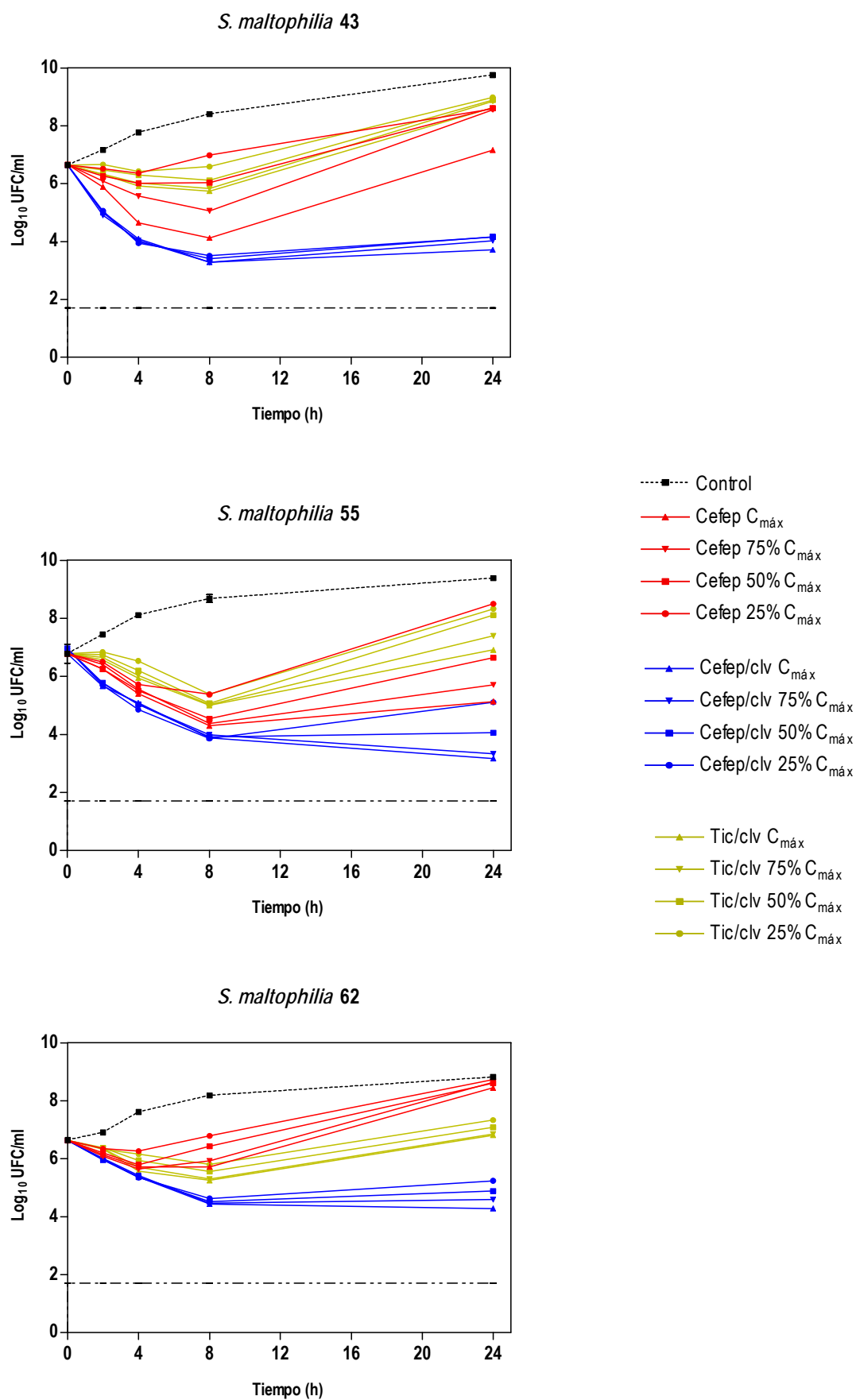
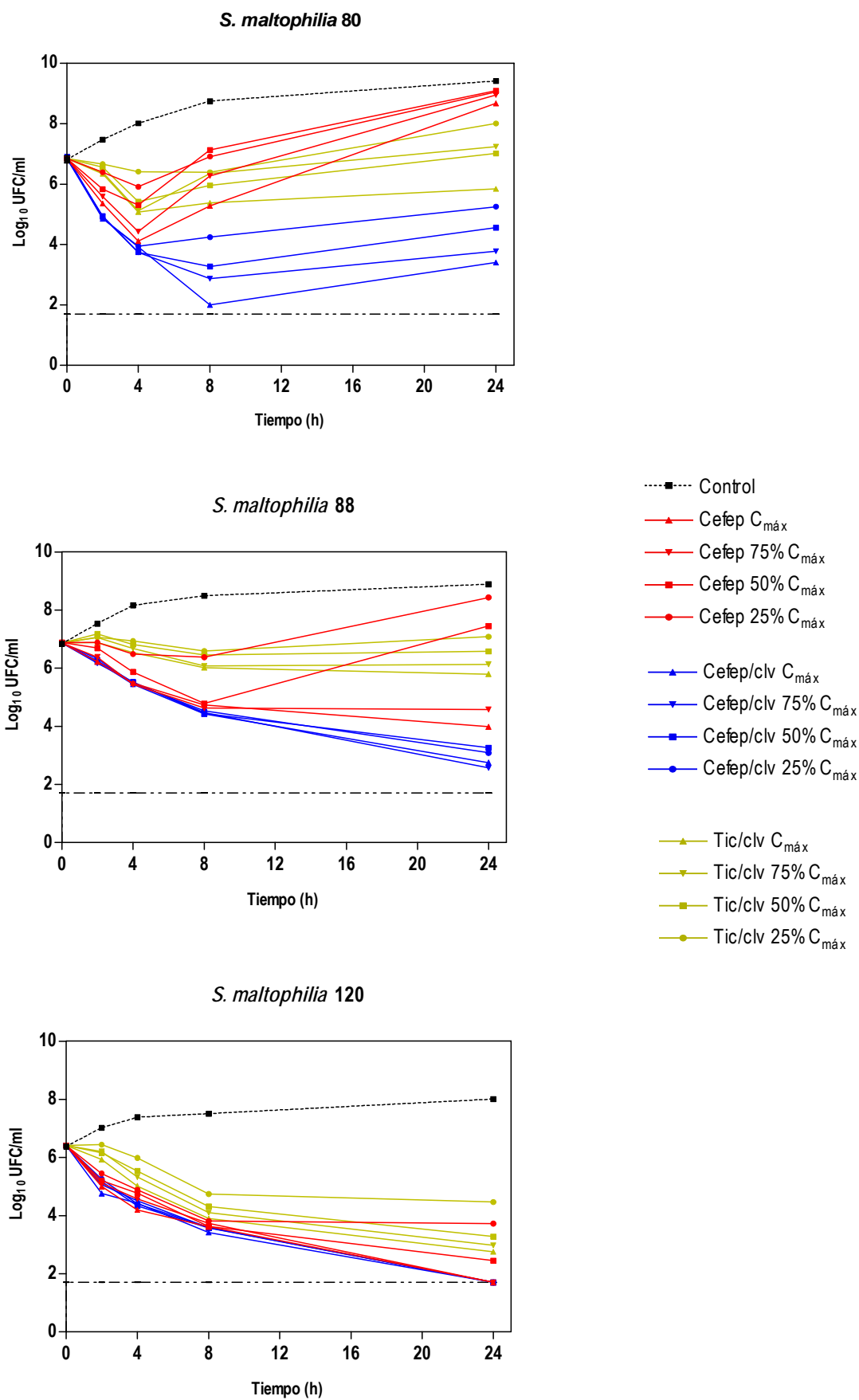


Figura 8: (continuación)



La figura 8 representa gráficamente la actividad de los antimicrobianos/combinaciones anteriormente referidas frente a las 12 cepas empleadas para el desarrollo de las curvas de letalidad.

La valoración de la actividad de cefepima ofreció pobres resultados, de forma que pese a que a la concentración máxima ($C_{\text{máx}}$) 8 de las 12 cepas testadas presentó un recuento de viables inferior al inóculo inicial, éste disminuyó significativamente al reducir la concentración de antimicrobiano: a la concentración 25% $C_{\text{máx}}$ sólo las cepas 22, 41 y 120 presentaron recuentos inferiores al inóculo inicial; es decir, a medida que disminuía la concentración de antimicrobiano los recrecimientos se hacían más pronunciados, detectándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) en 7 de las 12 cepas.. Así, tras 24 horas de estudio, en el caso de cefepima se observó efecto bactericida entre 3 cepas a $C_{\text{máx}}$ y 1 a 25% $C_{\text{máx}}$, de forma que sólo frente a la cepa 22 se produjeron reducciones en el recuento de viables superiores a los 3 logaritmos a cualquiera de las concentraciones testadas.

A la vista de los resultados presentados en la tabla 17 y la figura 8, con independencia de la sensibilidad de los aislamientos la adición del inhibidor de betalactamasas restauró la actividad de cefepima frente a todas las cepas estudiadas; los incrementos en la actividad de la combinación respecto a cefepima sola fueron estadísticamente significativos para 2 o más de las concentraciones testadas frente a todos los aislados, excepto las cepas 22 y 120 (destacan: cepas 43 y 62, con $p < 0,001$ para cualquiera de las concentraciones testadas; y cepa 23, con $p < 0,01$ para todas las concentraciones, excepto CFP $C_{\text{máx}}$ vs C/C 25%). El efecto sinérgico observado al combinar cefepima con ácido clavulánico fue especialmente evidente a bajas concentraciones de cefepima. Los aumentos progresivos de la concentración de cefepima en la combinación, se tradujeron en destacados incrementos de la actividad y en una reducción paulatina en la detección de los efectos sinérgicos. Por una parte, el número de aislados en los que se observó sinergismo entre cefepima y ácido clavulánico disminuyó de 9 para 25% $C_{\text{máx}}$

(menor concentración) a 5 para $C_{\text{máx}}$ (concentración máxima), de las 12 cepas testadas; siendo este efecto especialmente evidente para las cepas 23, 43, 55, 62 y 80, en las que se observó sinergismo para todas las concentraciones analizadas. Por otro lado, el incremento en la actividad fue significativo tal y como muestran los resultados presentados en la tabla 17 y la figura 8, resumiéndose en la tabla 18 el número de aislados en los que se observó actividad bactericida de los diferentes antimicrobianos testados a las 8 y 24 horas de estudio.

Tabla 18: Número de aislados en los que se observó actividad bactericida (reducción $>3 \log_{10}$ UFC/ml) a las 8 y 24 horas de estudio frente a cefepima (CFP), cefepima-ácido clavulánico (2 mg/l) (C/C 2) y ticarcilina-ácido clavulánico (2 mg/l) (T/C 2).

	$C_{\text{máx}}$		75% $C_{\text{máx}}$		50% $C_{\text{máx}}$		25% $C_{\text{máx}}$	
	8 h	24 h	8 h	24 h	8 h	24 h	8 h	24 h
CFP	2	3	2	2	0	2	0	1
C/C 2	5	10	5	8	5	5	4	4
T/C 2	0	1	0	1	0	1	0	0

En las tablas 17 y 18 se aprecia la elevada actividad bactericida de la combinación cefepima- ácido clavulánico (2 mg/l) frente a todos los aislados a cualquier concentración estudiada, incluso frente a los aislados resistentes a ticarcilina- ácido clavulánico (2 mg/l). Sólo en el caso de la cepa 2 se observó un recremento por encima del inóculo inicial tras 24 horas de estudio que correspondió a la concentración 25% $C_{\text{máx}}$, aunque éste fue muy leve ($0,6 \pm 0,1 \log_{10}$ UFC/ml). En el caso de las cepas 43 y 62, pese a observarse claras reducciones en el recuento de viables la actividad de la combinación no alcanzó a ser bactericida. Las cepas 22 y 120 presentaron la mayor sensibilidad frente a cefepima- ácido clavulánico (2mg/l), con reducciones en el recuento de viables respecto al inóculo inicial que superaron los 4,5 logaritmos para cualquiera de las concentraciones testadas.

Los resultados correspondientes a ticarcilina- ácido clavulánico (2 mg/l) mostraron una moderada actividad frente a los aislados estudiados. En general, se apreció recrecimiento bacteriano entre las 8 y 24 horas de exposición, siendo especialmente acusado para las concentraciones 50% $C_{m\acute{a}x}$ y 25% $C_{m\acute{a}x}$. De esta forma, sólo las cepas 1, 2, 19, 22 y 120 mostraron recuentos de viables inferiores al inóculo inicial para cualquiera de las concentraciones testadas. Sólo se observó efecto bactericida de ticarcilina- ácido clavulánico (2 mg/l) frente a la cepa 120 ($C_{m\acute{a}x}$, 75% $C_{m\acute{a}x}$ y 50% $C_{m\acute{a}x}$). Respecto a cefepima, ticarcilina/clavulánico presentó mayor actividad frente a los aislados 23, 62, 80 y 88 (estas diferencias fueron estadísticamente significativas para la cepa 62, a cualquiera de las concentraciones testadas, y para la cepa 88, a la máxima concentración de cefepima respecto a todas las concentraciones de ticarcilina-clavulánico, y al 75% del cefepima respecto a las concentraciones de ticarcilina-clavulánico del 25% y 50%).

En todos los casos la adición de clavulánico restauró la actividad de cefepima frente al microorganismo, obteniendo resultados mejores que los correspondientes a ticarcilina- ácido clavulánico. Excepto para la cepa 120 (que no presentó diferencias estadísticamente significativas en ningún caso), al comparar los resultados de cefepima-ácido clavulánico y ticarcilina-ácido clavulánico las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para al menos 3 de las concentraciones estudiadas; entre éstos, destacan los resultados correspondientes a los aislados 43, 62 y 88, para los cuales la mayor actividad de cefepima-ácido clavulánico respecto a ticarcilina-ácido clavulánico presentó una $p < 0,001$ a cualquiera de las concentraciones testadas.

Destacar, asimismo, el hecho de que el aumento detectado en la actividad cefepima-ácido clavulánico a medida que se incrementaba la concentración de cefepima, aunque fue evidente, no presentó significación estadística entre las diferentes concentraciones para 10 de los 12 aislados (en el caso de la cepa 23 existieron diferencias significativas para la

concentración máxima y 75% respecto a las concentraciones 50% y 25%; para la cepa 41 las diferencias entre la $C_{m\acute{a}x}$ -50% y 25% también fueron significativas).

En ninguna de las combinaciones estudiadas se observó efecto antagónico entre los antimicrobianos combinados.

· 4.3.2. Betalactámicos-Quinolonas

El estudio de muerte bacteriana frente a combinaciones de betalactámicos y quinolonas se realizó con cuatro (cepa 1, cepa 19, cepa 55 y cepa 43) de los doce aislados que se emplearon en el estudio de letalidad frente a betalactámicos-inhibidor de betalactamasas, de esta forma las cepas presentaban pulsotipo único, eran resistentes a cefepima (32, 64, 64 y 128 mg/l, respectivamente) y presentaban diferente sensibilidad a gatifloxacino (2, 4, 2 y 8 mg/l, respectivamente), cuya combinación fue analizada.

La tabla 19 muestra los resultados obtenidos con la combinación de cefepima y gatifloxacino a diferentes concentraciones en las curvas de muerte, así como los resultados correspondientes a los antibióticos estudiados de forma aislada; estos resultados quedan expresados como la media \pm desviación estándar de tres repeticiones, resaltando con un asterisco aquellas combinaciones que presentaron un efecto sinérgico (reducción de al menos 2 \log_{10} UFC/ml con respecto a cefepima o gatifloxacino en solitario) sobre las cepas ensayadas.

La figura 9 corresponde a la representación gráfica del recuento de microorganismos viables (\log_{10} UFC/ml) a lo largo de las 24 horas de estudio.

Tal y como muestran la tabla 19 y la figura 9, la combinación de cefepima y gatifloxacino aumentó la actividad de cefepima o gatifloxacino en solitario frente a todas las cepas, aportando efectos sinérgicos evidentes en la mayoría de las concentraciones combinadas: de las cuatro cepas ensayadas se observó efecto bactericida (reducción del crecimiento bacteriano en al menos 3 \log_{10} respecto al inóculo inicial) en 2 cepas, 3 cepas y 4 cepas para $C_{m\acute{a}x}$, CMI y 2xCMI,

Tabla 19: Reducción en el recuento de microorganismos viables (log UFC/ml) observada con cefepima y gatifloxacino, así como la combinación de ambos, tras 24 horas de estudio.

Cepa	Cefepima			Gatifloxacino			Cefepima-gatifloxacino		
	$C_{\text{máx}}^a$	CMI	2xCMI	$C_{\text{máx}}^b$	CMI	2xCMI	$C_{\text{máx}}$	CMI	2xCMI
1	-1,8±0,4	2,1±0,3	0,3±0,1	-0,1±0,2	0,5±0,4	-0,1±0,2	-4,2 ±0,9*	-1,4±0,2*	-3,6±0,7*
19	-1,3±0,3	1,1±0,9	-1,1±0,5	0,8±0,3	0,8±0,3	0,6±0,3	-2,5±0,1	-1,1±0,1*	-3,3±0,8*
43	1,5±0,1	1,8±0,2	1,7±0,1	0,3±0,0	-0,3±0,2	-2,0±0,5	0,1±0,1	-0,3±0,4	-4,2±1,0*
55	-0,9±0,3	1,4±0,3	0,5±0,5	1,0±0,3	1,3±0,2	1,0±0,3	-4,9±0,1 *	-0,0±0,6*	-2,9±0,2*

(a) $C_{\text{máx}}$ cefepima: 163,9 µg/ml ⁽¹¹⁰⁾; (b) $C_{\text{máx}}$ gatifloxacino: 4 µg/ml ⁽¹¹²⁾

Figura 9: Actividad de cefepima (Cefep), cefepima-ácido clavulánico (2mg/l) (Cefep/Gati) y gatifloxacino (Gati) a diferentes concentraciones, frente a 4 aislados clínicos de *S. maltophilia*.

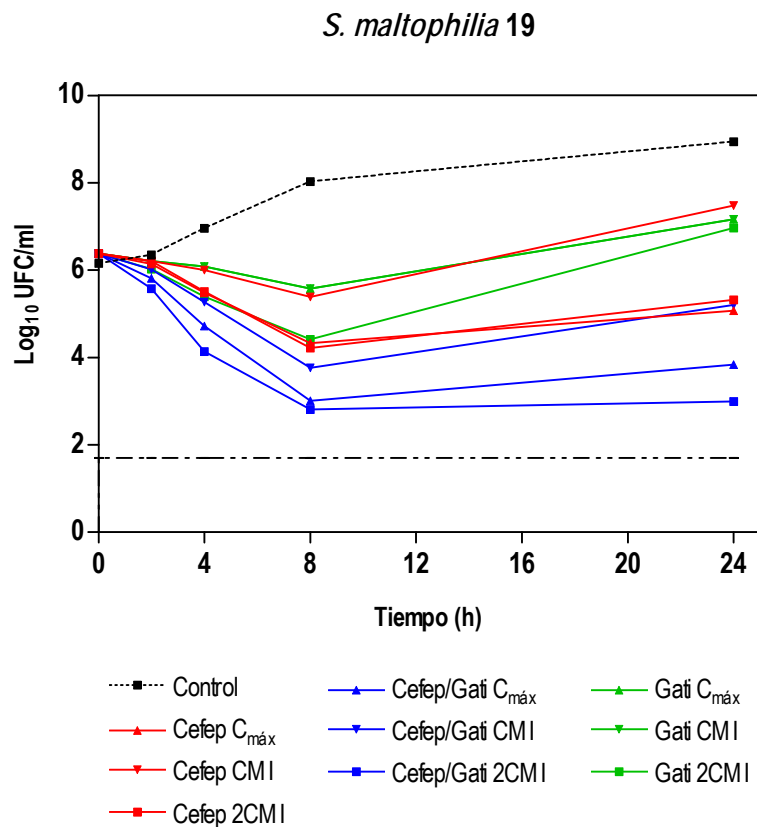
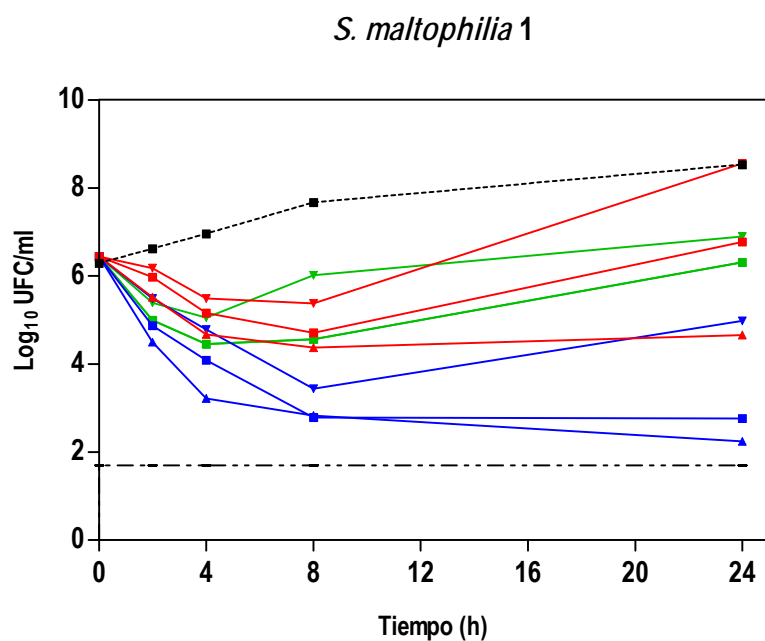
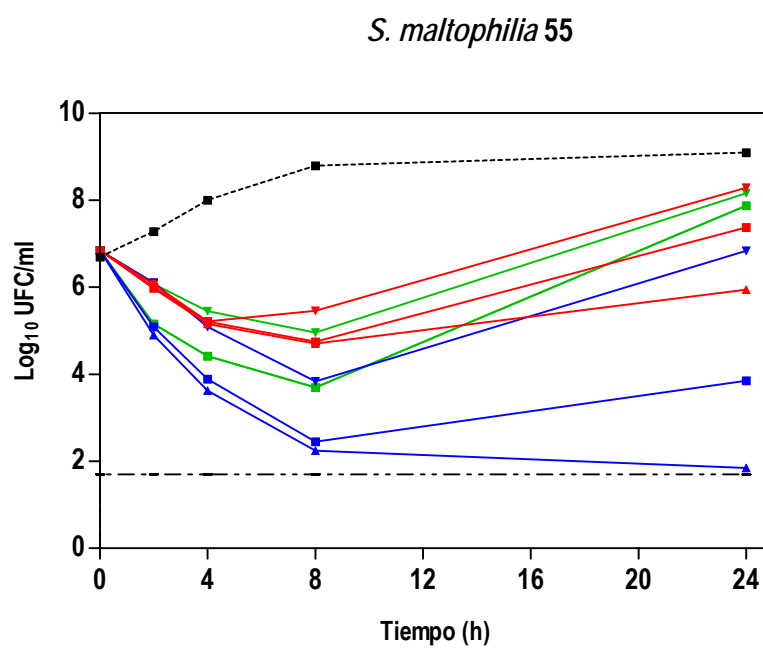
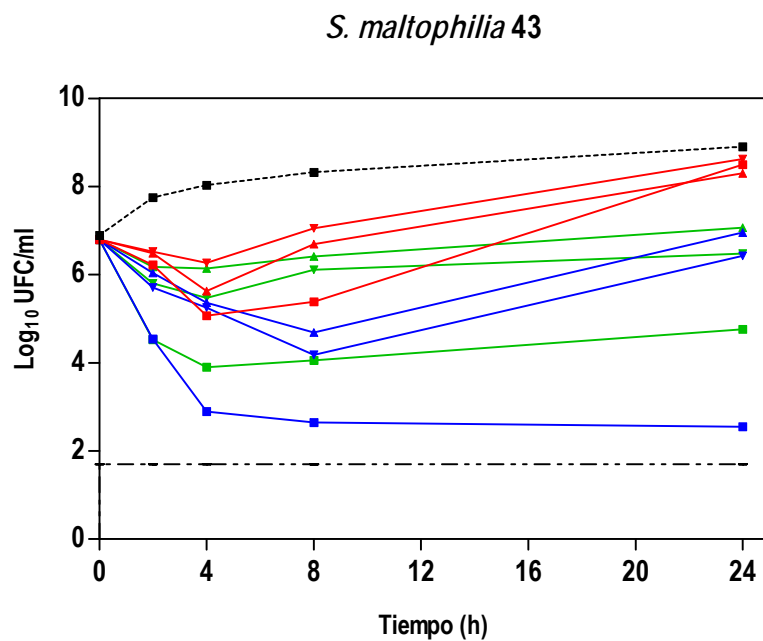


Figura 9: (continuación).



..... Control	—▲— Cefep/Gati $C_{m\acute{a}x}$	—▲— Gati $C_{m\acute{a}x}$
—▲— Cefep $C_{m\acute{a}x}$	—▼— Cefep/Gati CMI	—▼— Gati CMI
—▲— Cefep CMI	—■— Cefep/Gati 2CMI	—■— Gati 2CMI
—■— Cefep 2CMI		

respectivamente. Pese al incremento en la actividad observada con la combinación, los recrecimientos bacterianos fueron patentes en todas las concentraciones sinérgicas a excepción de las representadas por cefepima-gatifloxacino a concentraciones máximas ($C_{m\acute{a}x}$) y 2xCMI en los aislados 1 y 19, a la $C_{m\acute{a}x}$ en el aislado 55 y 2xCMI en el aislado 43.

· 4.3.3. Betalactámicos-inhibidor de betalactamasas frente a betalactámicos-quinolonas

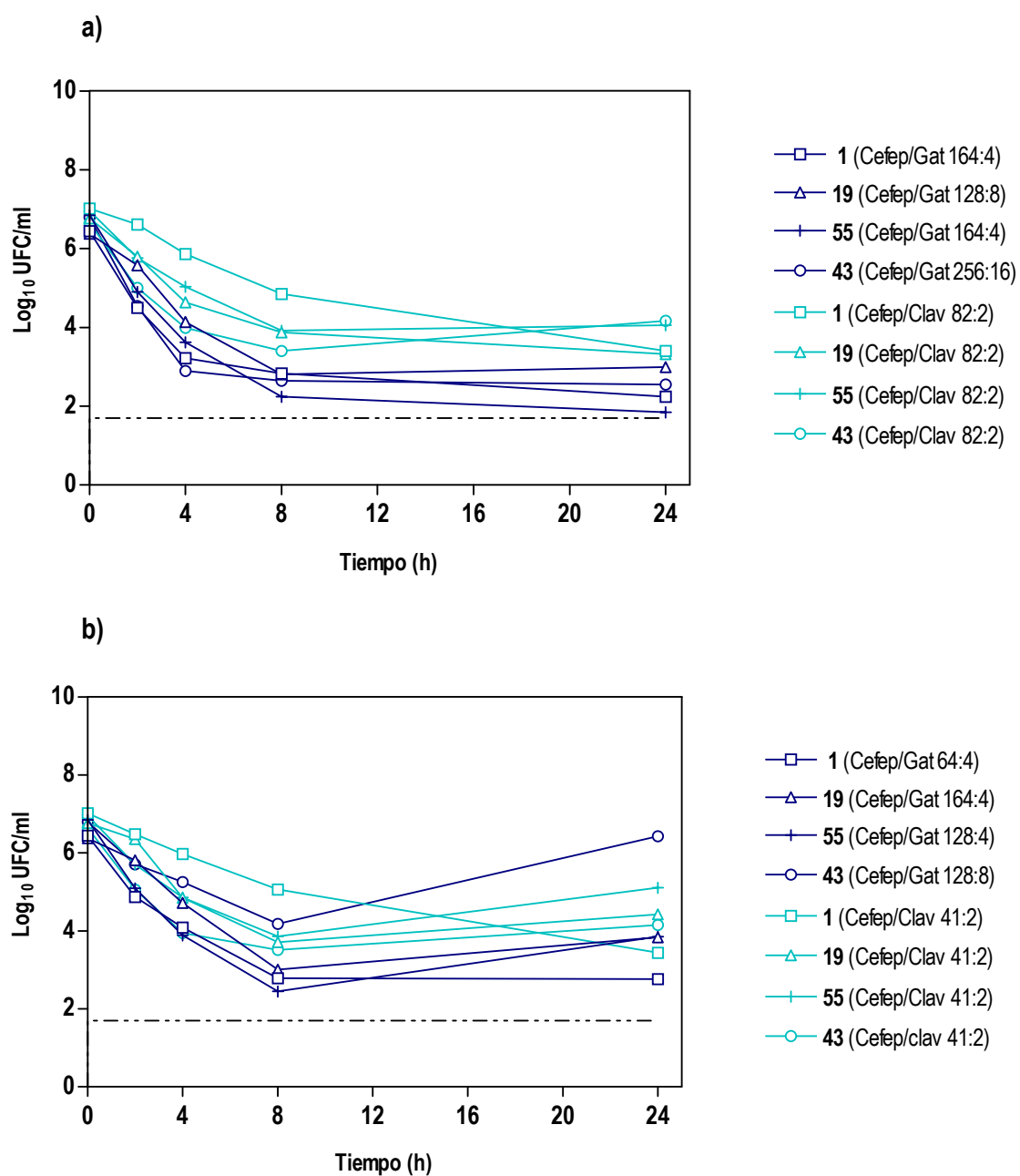
La figura 10 refleja la comparación gráfica de las curvas de muerte bacteriana correspondientes a las combinaciones sinérgicas de cefepima y gatifloxacino más activas frente a la actividad desarrollada por cefepima al 50% (gráfica “a”; 82 mg/l) y 25% (gráfica “b”; 41 mg/l) de su concentración máxima, en combinación con ácido clavulánico a una concentración de 2 mg/l.

En la gráfica “a” se representan las curvas de muerte correspondientes a la combinación de cefepima-gatifloxacino más activa para cada una de las cepas estudiadas (aislado 1 $C_{m\acute{a}x}$; aislado 19 2xCMI; aislado 43 2xCMI; aislado 55 $C_{m\acute{a}x}$) frente a la actividad observada por la combinación de cefepima al 50% de su $C_{m\acute{a}x}$ con ácido clavulánico en una concentración de 2 mg/l. En este caso, los resultados obtenidos para ambas combinaciones son muy similares, observando una mayor actividad para la combinación cefepima-gatifloxacino en todas las cepas estudiadas.

En la gráfica “b” se representan las curvas de muerte correspondientes a la combinación de cefepima-gatifloxacino que presentó la segunda mejor actividad para cada una de las cepas estudiadas (aislado 1 2xCMI; aislado 19 $C_{m\acute{a}x}$; aislado 43 CMI; aislado 55 2xCMI) frente a la actividad observada por la combinación de cefepima al 25% de su $C_{m\acute{a}x}$ con ácido clavulánico en una concentración de 2 mg/l. En este caso, los aislados también presentaron un comportamiento similar frente a la combinación de betalactámico-quinolona respecto a la combinación

betalactámico-inhibidor de betalactamasas, destacando la cepa 1 por ser el único aislado que no presentó recrecimiento a partir de las 8 horas.

Figura 10: Reducción en el recuento de microorganismos viables (\log_{10} UFC/ml) tras 24 horas de estudio: cefepima-gatifloxacino (Cefep/Gati) frente a cefepima-ácido clavulánico (Cefep/Clav).



En cualquier caso, la actividad desarrollada por mayores concentraciones de cefepima-ácido clavulánico fue muy superior a la desarrollada por cualquiera de las concentraciones de cefepima-gatifloxacino (tablas 17 y 19); diferencias que resultaron ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Asimismo, comparando los resultados de ticarcilina-ácido clavulánico y cefepima-gatifloxacino correspondientes a los cuatro aislados seleccionados, se observó una mayor actividad de la segunda combinación respecto a la primera; en este caso, las diferencias fueron estadísticamente significativas para Cefep/gati $C_{\text{máx}}$ y Cefep/gati 2CMI respecto a Ticar/clav 75%, Ticar/clav 50% y Ticar/clav 25% para todas las cepas analizadas.

4.4. SISTEMA FARMACODINÁMICO "IN VITRO"

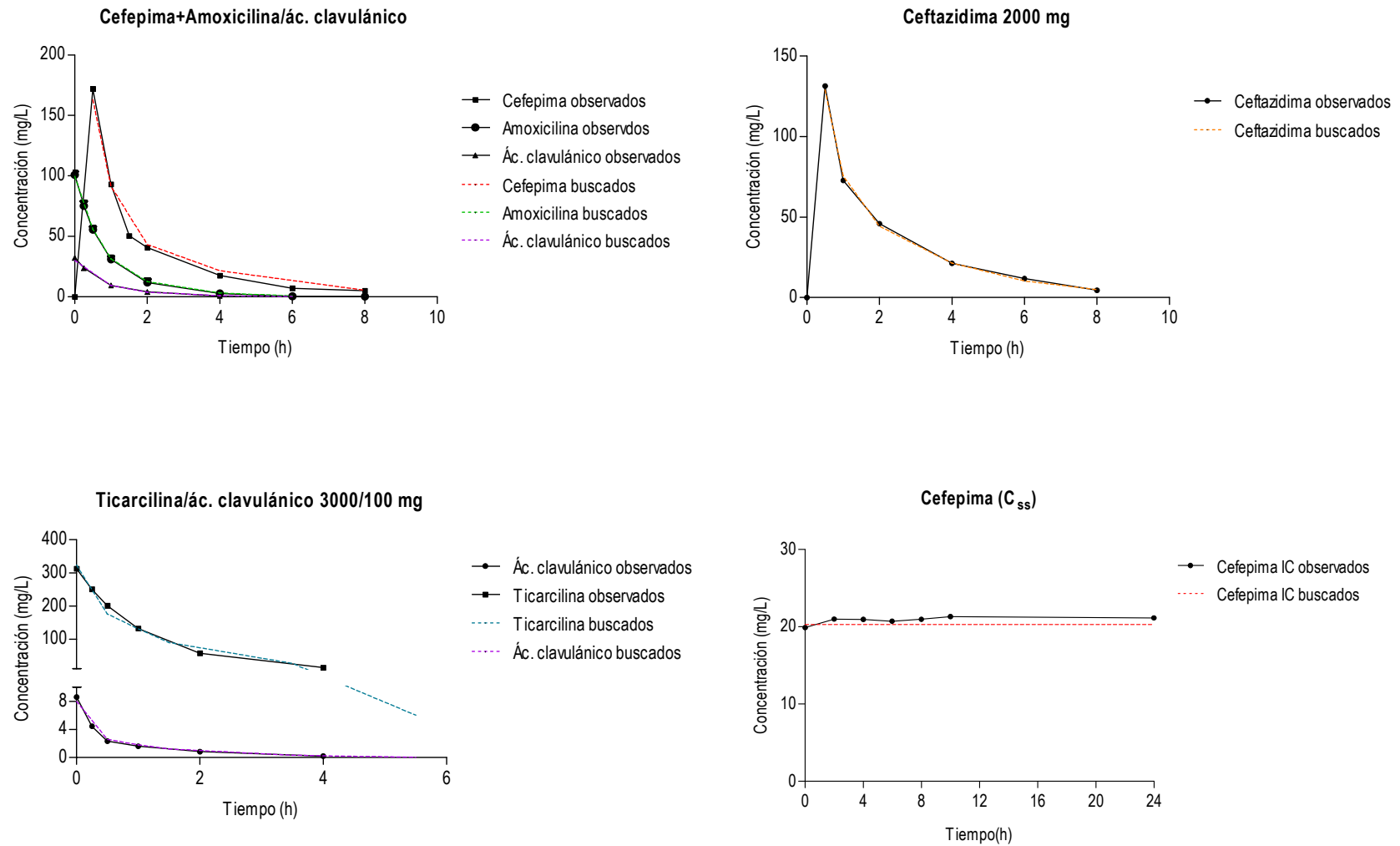
La tabla 20 presenta el perfil de sensibilidad de los 4 aislados clínicos de *S. maltophilia*, no relacionados desde un punto de vista epidemiológico, seleccionados para el estudio desarrollado con el sistema farmacodinámico *in vitro*.

Tabla 20: Sensibilidad (CMI) tras 24/48 horas de incubación a cotrimoxazol (TMP/SMX), cefepima (CFP), cefepima+2 mg/l de ácido clavulánico (C/C(2)), ticarcilina+2 mg/l de ácido clavulánico (T/C(2)) y ceftazidima (CTZ).

Cepa	TMP/SMX		CFP		C/C(2)		T/C(2)		CTZ	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
43	8	8	128	128	8	8	128	256	256	>256
80	0,25	0,25	64	64	16	16	128	128	256	256
88	128	128	32	32	4	8	128	128	64	64
120	2	2	32	64	8	8	64	64	128	128

* Resistente a TMP/SMX; ≥ 4 , CFP ≥ 32 , T/C (2) ≥ 128 , CTZ ≥ 32

Figura 11: Comparación gráfica de la farmacocinética de los diferentes antimicrobianos: datos calculados tras la simulación de las diferentes administraciones (observados) respecto a datos buscados (referencia).



· 4.4.1. Farmacocinética

Mediante el sistema *in vitro* se reprodujo el perfil farmacocinético de ceftazidima, ticarcilina y cefepima, solos o en combinación con ácido clavulánico, como es el caso de ticarcilina, o la asociación amoxicilina-ácido clavulánico, en el caso de cefepima, a las dosis indicadas en el apartado “III. 5. 5” del “Material y Métodos”. Resultados representados en la figura 11.

Las concentraciones reproducidas fueron medidas mediante ensayo microbiológico y presentaron una variación de entre 2,7-10,49% (modas de porcentaje de error para cada uno de los antimicrobianos simulados: ver tabla 21) respecto a las concentraciones buscadas, de forma que los parámetros farmacocinéticos AUC_{0-t} ($h \times mg/l$), $C_{m\acute{a}x}$ (mg/l) y $t_{1/2}$ (h) simulados se encontraron dentro de la desviación estándar observada en humanos (ver tablas 22 a 25; tomar como referencia los datos expuestos en la tabla 4).

Tabla 21: Moda del porcentaje de error de las concentraciones reproducidas, constituyen el porcentaje de error de cada proceso.

	% Error	
	Proceso	$T_{1/2}$
Ticarcilina	9,12	6,38
Ác. clavulánico 100 mg	10,13	6,38
Ceftazidima	5,32	3,06
Cefepima IV	10,29	10,50
Amoxicilina	10,49	1,01
Ác. clavulánico 200 mg	8,21	2,04
Cefepima IC (C_{ss})	2,70	-

Tabla 22: Parámetros farmacocinéticos calculados después de la simulación de cefepima 2000 mg en infusión endovenosa durante 0,5 horas y amoxicilina-ácido clavulánico 1000/200 mg IV

	Cefepima 2000mg		Amoxicilina 1000mg		Ác. clavulánico 200mg	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
AUC_{total} (hr _x mg/l)	262,91	7,96	94,82	7,40	29,59	0,68
C_{últ} (mg/l)	5,13	1,27	0,22	0,17	0,24	0,06
C_{máx} (mg/l)	172,08	3,25	100,88	2,69	32,18	0,33
T_{1/2} (h)	1,81	0,06	0,99	0,11	0,98	0,06
T_{últ} (h)	8,00	0,00	8,00	0,00	6,00	0,00
T_{máx} (h)	0,50	0,00	-	-	-	-

Tabla 23: Parámetros farmacocinéticos calculados después de la simulación de ceftazidima 2000 mg en infusión endovenosa durante 0,5 horas

	Ceftazidima 2000mg	
	Media	SD
AUC_{total} (hr _x mg/l)	244,30	23,17
C_{últ} (mg/l)	8,27	4,23
C_{máx} (mg/l)	131,47	6,16
T_{1/2} (h)	1,96	0,23
T_{últ} (h)	7,00	1,15
T_{máx} (h)	-	-

Tabla 24: Parámetros farmacocinéticos calculados después de la simulación de ticarcilina-ácido clavulánico 3000/100 mg IV

	Ticarcilina 3000mg		Ác. clavulánico 100mg	
	Media	SD	Media	SD
AUC_{total} (hr·mg/l)	361,27	35,41	5,35	0,31
C_{últ} (mg/l)	14,49	4,94	0,19	0,08
C_{máx} (mg/l)	312,76	6,80	8,61	2,03
T_{1/2} (h)	0,94	0,11	0,94	0,11
T_{últ} (h)	4,00	0,00	4,00	0,00
T_{máx} (h)	-		-	

Tabla 25: Parámetros farmacocinéticos calculados después de la simulación de cefepima 4000 mg en infusión continua

	Cefepima 4000mg	
	Media	SD
AUC_{total} (hr·mg/l)	505,59	23,25
C_{ss}^a (mg/l)	20,85	0,93
C_{máx} (mg/l)	21,34	1,08
C_{min} (mg/l)	19,88	0,38
T_{1/2} (h)	-	-

(a) C_{ss}: se estimó como la media de al menos tres puntos determinados durante el periodo de infusión continua

· 4.4.2. Farmacodinamia: actividad antibacteriana comparativa

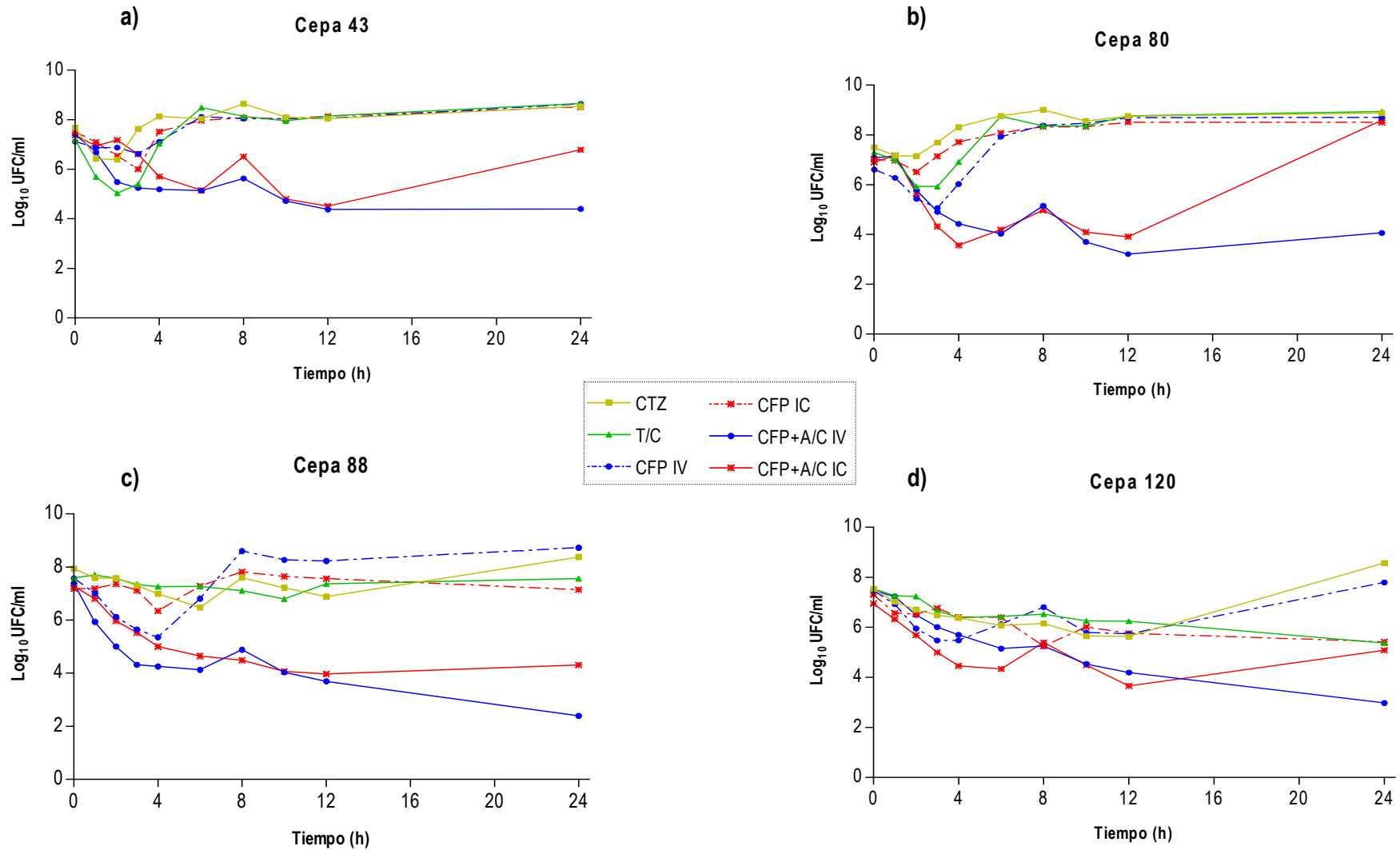
Las medidas de efecto antibacteriano calculadas para cada régimen antimicrobiano simulado frente a las cepas estudiadas se resumen en la tabla 26 y su representación gráfica corresponde a la figura 12; en todas las representaciones gráficas el límite de detección fue de 1,7 logaritmos.

Tabla 26: Efecto antibacteriano comparativo de ceftazidima 2g IV cada 8 horas (CTZ IV q 8h); ticarcilina-ác. clavulánico 3,1 g cada 6 horas (T/C IV q 6h); cefepima (CFP IV q 8h); la combinación cefepima 2g IV con amoxicilina-ác. clavulánico 1/0,2 g IV cada 8 horas (CFP+A/C IV q 8h); cefepima 4g infusión continua (CFP IC); la combinación cefepima 4g infusión continua con amoxicilina-ác. clavulánico 1000/200 mg IV cada 8 horas (CFP+A/C IC+IV q 8h).

Antimicrobiano	Cepa Sma	%RII				$\Delta 24$ (log ₁₀ UFC/ml)	T _{99,9%} (h)
		6h	8h	12h	24h		
CTZ IV q 8h	43	R	R	R	R	0,9	> 24
	80	R	R	R	R	1,4	> 24
	88	96,0	28,4	89,0	R	0,4	> 24
	120	95,1	95,6	97,8	R	1,0	> 24
T/C IV q 6h	43	R	R	R	R	1,5	> 24
	80	R	R	R	R	1,6	> 24
	88	50,8	65,9	25,1	R	0,0	> 24
	120	91,7	84,1	94,6	99,3	-2,2	> 24
CFP IV q 8h	43	R	R	R	R	1,5	> 24
	80	R	R	R	R	2,1	> 24
	88	82,5	R	R	R	1,2	> 24
	120	95,3	78,1	98,1	R	0,3	> 24
CFP+A/C IV q 8h	43	99,2	96,1	99,9	99,9	-3,0	12
	80	99,9	98,6	100,0	99,9	-3,0	6
	88	99,9	99,7	100,0	100,0	-5,0	3
	120	99,4	99,4	99,9	100,0	-4,5	12
CFP IC	43	R	R	R	R	1,0	> 24
	80	R	R	R	R	1,5	> 24
	88	R	R	R	5,9	0,0	> 24
	120	86,8	98,8	96,1	98,6	-1,9	> 24
CFP+A/C IC+IV q 8h	43	99,4	86,0	99,8	73,9	-0,6	> 24
	80	99,8	98,8	99,9	R	1,7	4
	88	99,8	99,8	99,9	99,9	-3,0	12
	120	99,7	97,1	99,9	98,4	-1,9	12

"R y +" indica recrecimiento por encima del inóculo inicial; "-" indica reducción del inóculo inicial

Figura 12: Actividad de ceftazidima IV 2g q.8 (CTZ), ticarcilina-ác. clavulánico IV 3,1 g q.6 (T/C), cefepima IV 2g q.8 (CFP IV), cefepima IC 4g (CFP IC), cefepima IV 2g+ amoxicilina-ác. clavulánico IV 1/0,2 g q.8 (CFP+A/C IV), cefepima IC 4g+amoxicilina-ác. clavulánico IV 1/0,2 g q.8 (CFP+A/C IC) frente a las cepas estudiadas.



En las simulaciones correspondientes a ticarcilina- ácido clavulánico 2 de los 3 aislados resistentes analizados presentaron evidentes recrecimientos (al menos 1,5 logaritmos) respecto al inóculo inicial transcurridas las 24 horas de tratamiento (figura 12, gráficas “a” y “b”). El tercer aislado resistente, cepa 88, no presentó un recrecimiento tan marcado tras el tratamiento, obteniéndose un recuento de viables muy próximo al inóculo inicial (figura 12, gráfica “c”). Por otro lado, la cepa 120, con un perfil de sensibilidad intermedia de acuerdo con los puntos de corte determinados por el CLSI (ver tabla 20), sí presentó una clara reducción en el recuento de viables que superó los 2 logaritmos tras 24 horas de tratamiento con la combinación ticarcilina- ácido clavulánico (figura 12, gráfica “d”).

En el caso de ceftazidima los recrecimientos fueron evidentes tras el tratamiento, superando al inóculo inicial entre 0,4 y 1,4 logaritmos (figura 12). Tal y como se puede apreciar en la tabla 20, las 4 cepas analizadas eran resistentes al antimicrobiano.

En cuanto a las simulaciones correspondientes a cefepima, la pauta que simula la administración en infusión cada 8 h (administración intermitente) presentó recrecimientos respecto al inóculo inicial de entre 0,3 y 2,1 logaritmos (figura 12), siendo todas las cepas resistentes a este fármaco (ver tabla 20). Contrastan con estos resultados los correspondientes a este mismo antimicrobiano con una pauta de administración en infusión continua; los recrecimientos experimentados por las cepas 43 y 80 eran aproximadamente 0,5 logaritmos inferiores a los observados para la administración intermitente (figura 12, gráficas “a” y “b”). Además, las cepas 88 y 120 no sólo no recrecieron, sino que en el caso de esta última la reducción del recuento de viables respecto al inóculo inicial alcanzó los 1,9 logaritmos, es decir, más del 90% de la población correspondiente a la cepa 120 fue erradicada por cefepima administrada en forma de infusión continua (figura 12, gráficas “c” y “d”).

La co-administración de cefepima con amoxicilina-ácido clavulánico aportó actividad bactericida (reducción $\geq 99,9\%$ del inóculo inicial) a lo largo de 24 horas de tratamiento. Tal y

como queda reflejado en la tabla 26, la actividad antibacteriana desarrollada por la combinación fue muy superior a la detectada por ticarcilina-clavulánico, ceftazidima y cefepima en ausencia de inhibidor de betalactamasas.

La administración intermitente en infusión de cefepima con amoxicilina- ácido clavulánico cada 8 horas produjo reducciones del recuento de microorganismos viables de, al menos, 3 logaritmos en las primeras 12 horas de tratamiento para todos los aislados; la fuerte acción antibacteriana ejercida por cefepima-amoxicilina-clavulánico ya quedó patente desde la hora 6 de tratamiento al detectarse reducciones en el recuento de viables que superaban el 99% (ver tabla 26 y figura 12). Esta actividad se mantuvo a lo largo de todo el tratamiento, de forma que al final del mismo la reducción respecto al inóculo inicial fue de entre 3 y 5 logaritmos.

La pauta de administración de cefepima en infusión continua-amoxicilina-clavulánico *in bolus* cada 8 horas, pese a presentar una significativa ($p<0,01$) menor eficacia que la pauta de administración intermitente de la combinación para todos los aislados, ofreció una buena actividad, presentando, tras 24 horas de tratamiento, reducciones en el recuento de viables respecto al inóculo inicial de 0,6, 1,9 y 3,0 logaritmos para las cepas 43, 120 y 88, respectivamente. La cepa 80, sin embargo, presentó un recrecimiento de 1,7 logaritmos respecto al inóculo inicial, pese a que hasta la hora 12 de tratamiento tuvo un comportamiento muy similar al desarrollado con la administración intermitente de la combinación.

Con independencia del tipo de administración de cefepima, no se observó en ningún caso un efecto antagónico consecuencia de la adición de amoxicilina a la mezcla cefepima-ácido clavulánico.

Por tanto, al comparar la actividad antibacteriana desarrollada por cada régimen antibiótico simulado se aprecia una marcada superioridad del tratamiento CFP+A/C IV cada 8 horas respecto a los demás, detectándose significación estadística ($p<0,01$) para las cuatro cepas estudiadas. La adición de ácido clavulánico a cefepima supuso una marcada recuperación

de la actividad frente a todas las cepas, que ya a las hora 6 era fácilmente apreciable. El aumento de la actividad respecto a CFP sola resultó estadísticamente significativo para las cepas 43 y 88 tanto a las 12 horas ($p < 0,001$), como a las 24 horas ($p > 0,001$), para ambas administraciones (intermitente e infusión continua) en la combinación CFP+A/C; para los aislados 80 y 120 este mismo efecto se observó sólo para la administración intermitente, puesto que para la administración en infusión continua la actividad fue prácticamente igual tras 24 horas de exposición.

· 4.4.3. Comprobación del posible desarrollo/selección de resistencias tras la administración del tratamiento antibiótico

- 4.4.3.1. Sensibilidad post-tratamiento

Los resultados del estudio de sensibilidad de los aislados recogidos tras 24 horas de simulación de las diferentes pautas de antimicrobiano/combinaciones analizadas se exponen en la tabla 27.

En general, tras la exposición a los diferentes regímenes de antibiótico estudiados, la CMI de casi todos los aislados varió (reducción o incremento) entre una dilución y, sólo en algunos casos, tres diluciones. Tomando como referencia los datos presentados en la tabla 20, ninguna de estas modificaciones, salvo en el caso de la cepa 120, fue significativa. La cepa 120, sólo tras el tratamiento con CAC IV, fue la única que experimentó una reducción generalizada en su perfil de sensibilidad.

- 4.4.3.2. Análisis del perfil poblacional

Los análisis del perfil poblacional (PAPs) de cada aislado pre- y post-tratamiento con cefepima 2000mg/8h cefepima IV 2000mg + amoxicilina/ácido clavulánico IV 1000/200mg cada 8 horas (CAC IV), y con cefepima en infusión continua 4000 mg + amoxicilina/ácido clavulánico IV

Tabla 27: Perfil de sensibilidad de los aislados derivados post-tratamiento frente a cefepima (CFP), cefepima-ácido clavulánico 2mg/l (C/C 2), ticarcilina-ácido clavulánico 2mg/l (T/C 2) y ceftazidima (CTZ).

Tratamiento simulado	Cepa Sma	CFP		C/C (2)	
		24h	48h	24h	48h
CFT IV q 8h	43	64	128	2	8
	80	64	64	16	16
	88	64	64	4	8
	120	64	128	16	16
T/C IV q 6h	43	32	64	4	16
	80	128	128	64	64
	88	64	64	4	4
	120	32	128	8	16
CFP IV q 8h	43	64	128	4	8
	80	128	128	16	16
	88	128	128	8	8
	120	32	256	16	64
CFP+A/C IV q 8h	43	64	128	4	8
	80	128	256	16	32
	88	64	64	2	8
	120	≤8	≤8	≤1	≤1
CFP IC	43	64	128	4	8
	80	64	128	8	16
	88	256	256	4	16
	120	n.d. ^(a)	n.d.	16	16
CFP+A/C IC+IV q 8h	43	128	256	16	64
	80	256	256	128	128
	88	128	128	16	16
	120	128	256	16	32
	ATCC	8	16	2	4

(a) n.d.: no determinado

Figura 13: Análisis del perfil poblacional de 4 aislados frente a cefepima, antes (Pre-tto) y después del tratamiento con cefepima 2g/8h cefepima IV 2g + amoxicilina/clavulánico IV 1/0,2mg cada 8 horas (CAC IV), y con cefepima en infusión continua 4g + amoxicilina/clavulánico IV 1/0,2g cada 8 horas (CAC IC).

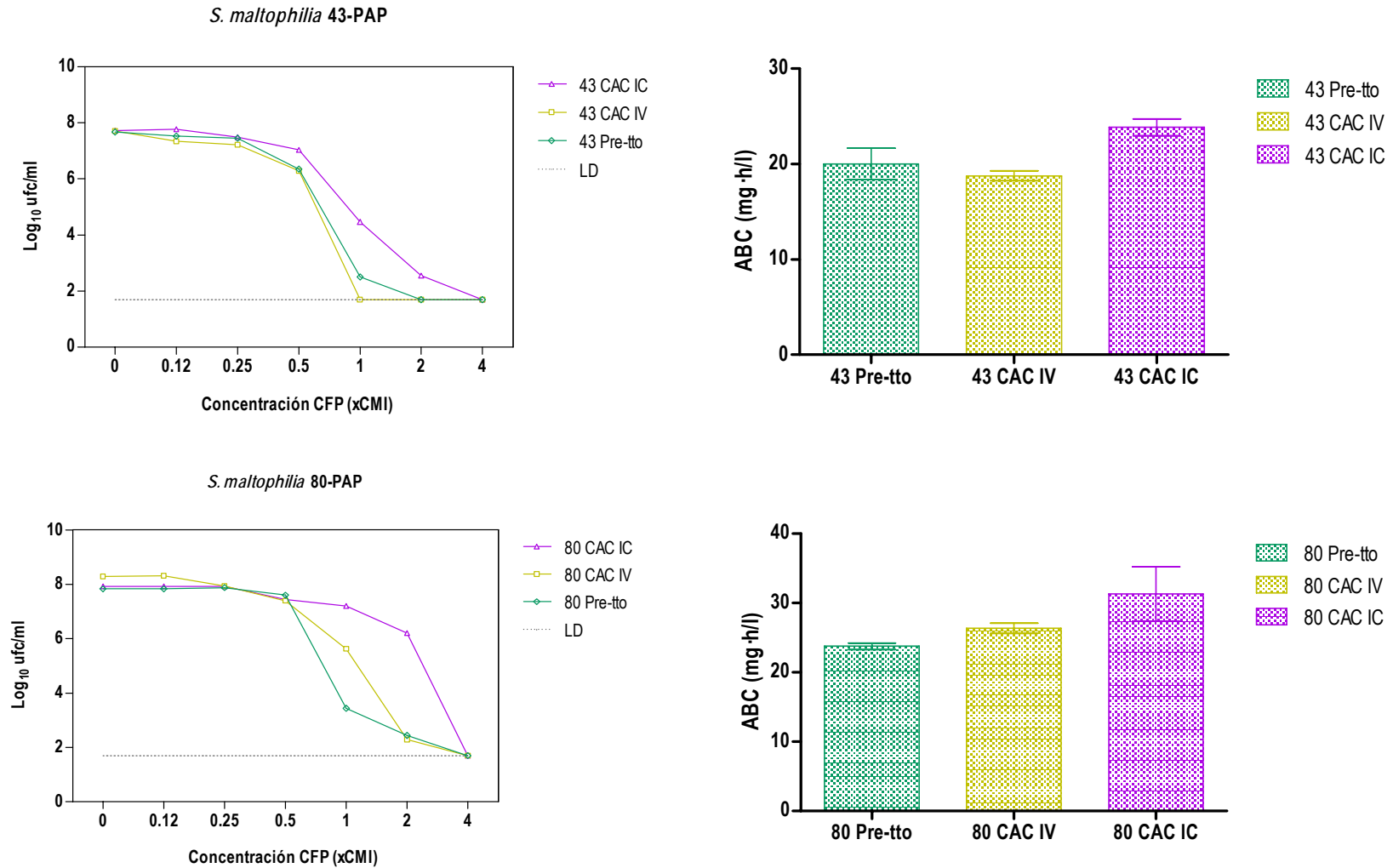
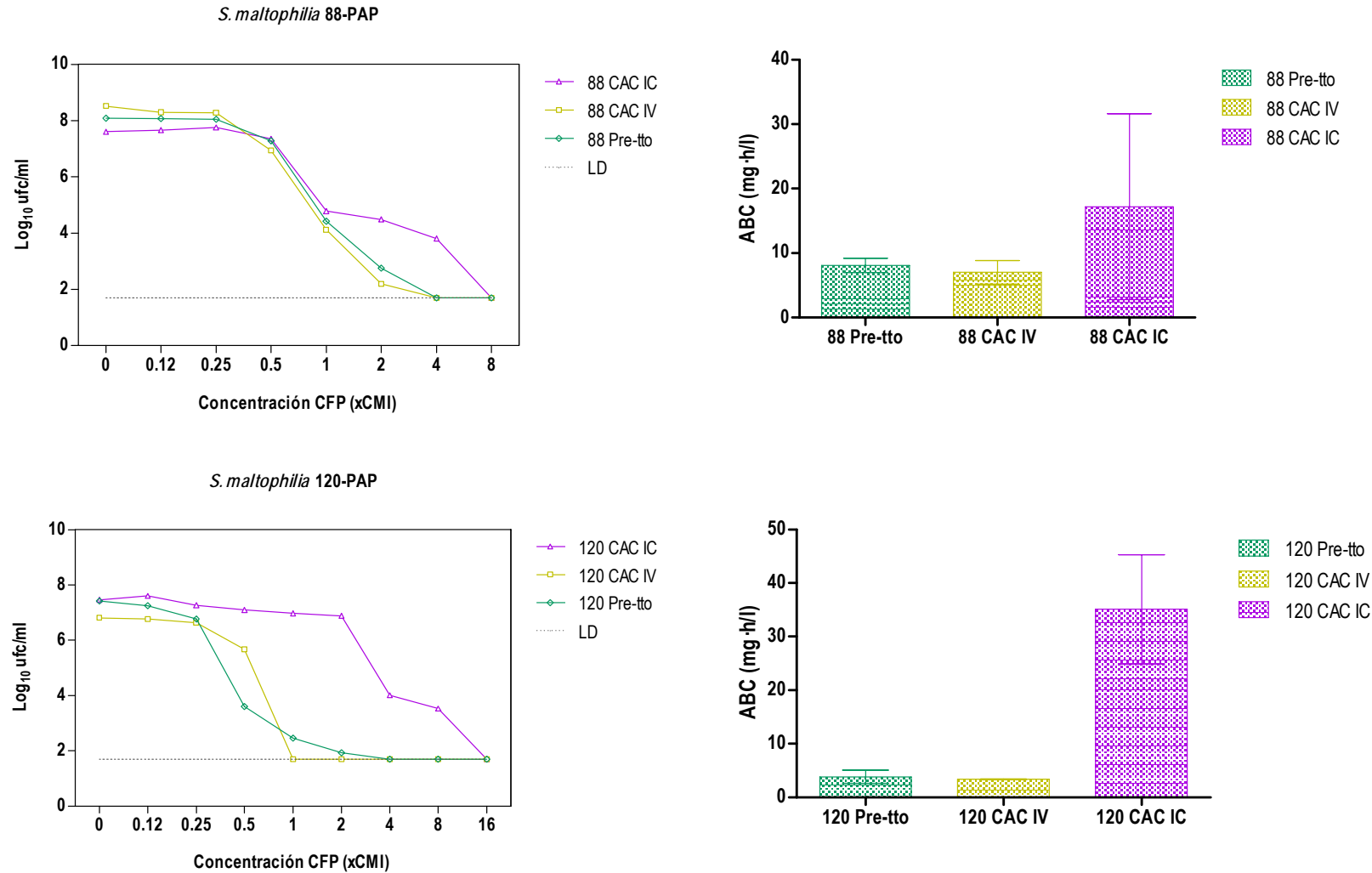


Figura 13: (continuación).



1000/200mg cada 8 horas (CAC IC) tras 72 horas de exposición a diferentes concentraciones de cefepima se representan en la figura 13.

A la vista de los resultados presentados en la figura 13, los 4 aislados estudiados presentaron crecimiento bacteriano frente a concentraciones de cefepima entre 0 y 1xCMI; para los 4 aislados las cepas recuperadas pos-tratamiento, tanto CAC IV como CAC IC, presentaron crecimiento a concentraciones que superaron la CMI.

La cepa 43 presentó un claro aumento del ABC tras el tratamiento con CAC IC que, sin embargo, no fue estadísticamente significativo respecto al ABC correspondiente a esa misma cepa pre-tratamiento. Esta diferencia sí resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto al ABC correspondiente al aislado recogido tras el tratamiento con la administración intermitente CAC IV, el cual presentó una reducción no significativa respecto al ABC pre-tratamiento. La dispersión de crecimiento observado alcanzó la concentración 4xCMI.

La cepa 80 presentó un aumento del ABC para los aislados recogidos tras ambos tratamientos; en cualquier caso, ninguno de estos incrementos, aunque evidentes, tuvo significación estadística. También en este caso la dispersión de crecimiento observado alcanzó la concentración 4xCMI.

La cepa 88 presentó un comportamiento similar al aislado 43, con una leve disminución del ABC-CAC IV respecto al ABC-pre-tratamiento (sin significación estadística). Respecto a este último, el ABC-CAC IC presentó un claro crecimiento que, sin embargo, tampoco resultó estadísticamente significativo. La dispersión de crecimiento observado alcanzó la concentración 4xCMI. La dispersión de crecimiento observado alcanzó la concentración 8xCMI.

Por último, para la cepa 120 también se observó una pequeña reducción del ABC-CAC IV respecto al ABC-pre-tratamiento. En este caso destaca el marcado aumento del ABC-CAC IC respecto a los dos anteriores, incremento que en ambos casos presentó significación estadística ($p < 0,01$). En este caso se observó la mayor dispersión de crecimiento al alcanzar la concentración 16xCMI.

DISCUSIÓN

Stenotrophomonas maltophilia es un bacilo gramnegativo, no fermentador de glucosa, que desde los años 80 ha ido ganando importancia al emerger como patógeno nosocomial, especialmente en pacientes severamente debilitados (4, 19, 20). De localización ubicua, el no poseer exigentes necesidades nutricionales hace posible que se establezca en el medio hospitalario en condiciones extremas.

Asociado a numerosos síndromes clínicos relacionados con diferentes tasas de morbilidad (pudiendo alcanzar hasta un 69% (19, 20, 30, 40)), a la hora de abordar el tratamiento de procesos infecciosos asociados a este microorganismo clínicos y microbiólogos se enfrentan a un reto difícil de salvar, dado que *S. maltophilia* presenta resistencia intrínseca a desinfectantes y numerosos antibióticos (entre los que se cuentan muchos de los antimicrobianos de amplio espectro disponibles hoy en día (4, 22, 80)), unido al hecho de que este patógeno es capaz de seleccionar mutantes que manifiestan resistencia pleiotrópica a lo largo del tratamiento (4). Todo esto reduce las opciones de tratamiento empírico frente a *S. maltophilia* básicamente a trimetoprim-sulfametoxazol, como tratamiento de elección, seguido de ticarcilina-ácido clavulánico e, incluso, la combinación de ambos y/o con otros compuestos (19, 22, 23, 65, 68, 72, 80, 84, 122, 123). Sin embargo, se ha documentado la aparición de resistencias a estos antimicrobianos (19, 22, 26, 69, 82, 83), por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas que nos permitan enfrentarnos a este patógeno.

Otro factor importante que hace necesaria la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas es el aumento progresivo de la población susceptible a colonización/infección por *S. maltophilia*. Numerosos trabajos han descrito la relación entre colonización/infección por este patógeno con factores como terapias inmunosupresivas, técnicas invasivas, estancias en la UCI, edad avanzada, hospitalización prolongada, enfermedades pulmonares previas, procedimientos quirúrgicos o tratamiento previo con betalactámicos de amplio espectro, aminoglucósidos o quinolonas (4, 14, 31, 88, 124).

Pese a no disponer de un conocimiento profundo de los factores de virulencia de *S. maltophilia*, sí está ampliamente reconocido su papel como patógeno oportunista. Ampliamente distribuido en el medio hospitalario, este microorganismo ha sido aislado en los pacientes como comensal, contaminante o formando parte de la flora endógena del propio individuo ⁽³⁰⁾. No existen muchos estudios sobre el estado de portador de *S. maltophilia*, no obstante si se ha referido la posibilidad de selección de este microorganismo a partir de localización respiratoria o gastrointestinal de cada paciente, o a partir de fuentes ambientales como posibles vías de entrada de este microorganismo ⁽⁴⁾.

Aunque la adquisición de *S. maltophilia* se produce principalmente en el ámbito hospitalario, no existen muchos estudios que demuestren su transmisión nosocomial. En los brotes nosocomiales descritos generalmente se identificaron diferentes reservorios ambientales como origen de los respectivos brotes ^(24, 26, 29, 77, 125); sin embargo, García de Viedma y cols. ⁽¹²⁶⁾ han demostrado, mediante técnicas epidemiológicas de tipificación molecular, que es posible una verdadera transmisión horizontal paciente-paciente. Para el estudio de los brotes nosocomiales se emplean, con diferente grado de éxito, las técnicas de tipificación con que se realizan los estudios epidemiológicos; así, es posible identificar fuentes ambientales o endógenas y la transmisión de cepas entre pacientes, permitiendo distinguir la adquisición de nuevas cepas y/o la aparición de variantes más resistentes tras el tratamiento antibiótico ⁽²³⁾. Entre las técnicas disponibles, las moleculares, especialmente la PFGE, destacan como método de tipificación epidemiológico para *S. maltophilia*, dado que la tipificación fenotípica es poco discriminadora entre cepas por la homogeneidad en el patrón de resistencia presentada por este microorganismo y el metabolismo relativamente inerte que le caracteriza ^(4, 26, 77, 127).

La caracterización genotípica mediante PFGE de los aislados recogidos en nuestro estudio permitió constatar el alto poder discriminatorio de esta técnica (índice de Simpson de 0,989), así como la elevada diversidad genética de *S. maltophilia* ya referida en diferentes

estudios (22, 26, 72, 83). El coeficiente de heterogeneidad genética obtenido en nuestro estudio (85,48%) es coherente con los resultados obtenidos por Ribera y cols. (128) (82%), entre otros (4, 25, 26, 83, 127). Entre los 124 aislados recogidos 28 cepas pertenecían a 10 perfiles PFGE diferentes, los patrones genéticos de los restantes 96 aislados fueron únicos. Las cepas clonalmente relacionadas, correspondientes a cada uno de los 10 perfiles PFGE anteriormente referidos, poseían un origen geográfico común; así mismo, los aislados que compartían un mismo perfil generalmente fueron recogidos de un mismo paciente, sólo el grupo comprendido por los aislados 1, 4, 6, 12 y 20 procedían de 2 pacientes distintos, sin embargo carecemos de suficientes datos que permitan profundizar en el conocimiento sobre una posible relación entre ambos pacientes. En cualquier caso, el alto poder discriminatorio observado al analizar las cepas de nuestro estudio no hace sino confirmar el papel de esta técnica en la identificación de posibles transmisiones en un brote, con el fin de identificar con la mayor celeridad posible el origen del mismo y evitar la aparición de nuevos casos.

Entre el amplio espectro de procesos infecciosos a los que está asociado *S. maltophilia*, son los relacionados con las vías respiratorias los más frecuentes, tal y como presentan diversos trabajos (4, 19, 22, 24, 29). Así, el tracto respiratorio ha sido descrito como el punto más habitual de aislamiento y colonización/infección por parte de este microorganismo, lo que concuerda con los datos correspondientes a nuestro estudio puesto que el origen biológico mayoritario de los aislados recogidos para nuestro estudio fue el tracto respiratorio (“muestras respiratorias”: 45,6% del total de los aislamientos recogidos). A este respecto, cabe destacar el alto porcentaje de aislados procedentes de muestras de orina que presentamos: cuando los porcentajes descritos en otros estudios oscilan entre 2,5 y 18% (30, 31, 127; 129), nosotros hemos alcanzado un 29,6%. Puesto que la frecuencia con que ocurre cada tipo de infección está condicionada por el tipo de paciente (31), el elevado porcentaje de muestras urinarias se debería a que el 22,4% de las muestras recibidas provinieron del Hospital de Paraplégicos de Toledo (origen geográfico

mayoritario de las muestras recibidas, por tanto), donde hay que tener en cuenta que en los pacientes con lesión medular la infección del tracto urinario es una de las principales dolencias que refieren, junto con la afección de vías respiratorias e infecciones de úlceras por presión ⁽¹³⁰⁾; en la tabla 7 es posible comprobar cómo las muestras urinarias supusieron el 46,43% del total recibido desde ese centro. Este hecho fue tenido en cuenta a la hora de valorar los resultados de sensibilidad por la posible transferencia de resistencias a *S. maltophilia* por parte de enterobacterias con las que pudiera estar en contacto.

A la hora de enfrentarnos al tratamiento de una enfermedad infecciosa, nadie puede discutir que el desarrollo de los antibióticos para la quimioterapia de las infecciones bacterianas ha supuesto uno de los mayores logros del siglo XX, al ser responsables de una importante reducción en la morbilidad causada por enfermedades infecciosas. Lamentablemente, la aparición en los últimos 40 años de las resistencias de los microorganismos constituye una amenaza para la Salud Pública ⁽¹³¹⁾. No sólo por el fallo clínico de un tratamiento empírico, sino también por el hecho de que el uso habitual de un determinado compuesto, y el consiguiente desarrollo de resistencias frente al mismo, conlleva la modificación de la estrategia a seguir en el tratamiento de las enfermedades infecciosas limitando las opciones terapéuticas frente a determinados patógenos y, con ello, haciendo necesario el empleo de antibióticos con un componente tóxico importante, o bien emplear elevadas concentraciones de antimicrobiano aumentando la posibilidad y/o gravedad de efectos secundarios asociados ⁽¹³²⁾.

La política de antibióticos que desarrolla cada centro es un factor que influye en el incremento progresivo de cepas resistentes, desarrollando mecanismos de resistencia de forma individual, por lo que es posible encontrar diferentes patrones de sensibilidad incluso en bacterias con el mismo origen clonal, y desplazando del medio hospitalario a las cepas más sensibles ⁽¹³³⁾.

El perfil de sensibilidad es, por tanto, muy importante a la hora de decidir la opción terapéutica con más opciones de éxito, con el fin de evitar tratamientos erróneos que pudieran suponer un incremento en la estancia hospitalaria del paciente, mayor mortalidad, recaídas o selección de cepas con mayores índices de resistencia. Considerando que las recomendaciones para el tratamiento de infecciones por *S. maltophilia* se basan en estudios *in vitro*, algunas pruebas clínicas no aleatorias y experiencias puntuales ^(20, 71, 134, 135), en nuestro estudio comenzamos a valorar posibles opciones para el tratamiento de colonizaciones/infecciones asociadas a este patógeno estudiando el patrón de sensibilidad frente a numerosos antimicrobianos.

A la dificultad que supone el carácter multirresistente de *S. maltophilia* a la hora de elegir un tratamiento frente este microorganismo, hay que sumarle la existencia de problemas metodológicos asociados a las pruebas para determinar la susceptibilidad. Las diferencias existentes entre los resultados de sensibilidad obtenidos en diferentes estudios podrían deberse a la distinta composición de los medios, presencia de cationes bivalentes, temperatura y tiempo de incubación e, incluso, a la variabilidad en el número de aislados recogidos en cada estudio ^(4, 67-70). En nuestro caso, y dada la ausencia de consenso en cuanto a la metodología indicada para determinar la sensibilidad de *S. maltophilia*, hemos empleado la técnica de dilución en Mueller-Hinton agar propuesto por Pankuch y cols. ⁽⁵³⁾, por presentar una mejor correlación con las curvas de muerte bacteriana. La incubación se realizó a 35° C, tal y como recomienda el CLSI; la lectura de resultados se realizó a las 24 horas, según describen Lecso-Bornet y cols. ⁽⁵⁴⁾, y a las 48 horas, propuestas por Carrol y cols. ⁽⁶⁷⁾ y Pankuch y cols. ⁽⁵³⁾.

Por otra parte, el carácter multirresistente de *S. maltophilia* podría verse afectado por la presión antibiótica presente en el medio hospitalario, con posteriores distorsiones en el análisis del perfil de sensibilidad a antimicrobianos. Pese a la elevada heterogeneidad genética que caracteriza a *S. maltophilia*, anteriormente referida, hay que considerar la posibilidad de

producirse brotes nosocomiales. De esta forma, los aislados repetidos, especialmente aquellos cuyo origen sea desconocido, podrían afectar al estudio de sensibilidad aportando datos acumulativos ⁽⁸³⁾. Así, mediante la realización previa de técnicas de tipificación molecular, en nuestro caso el PFGE, estas posibles distorsiones podrían atenuarse seleccionándose aquellas cepas con pulsotipo único.

Como ya ocurriera en trabajos previos ⁽⁴⁾, en nuestro estudio *S. maltophilia* presentó una marcada resistencia frente a numerosos antimicrobianos, incluidos betalactámicos, aminoglucósidos y macrólidos.

Todos los aminoglucósidos mostraron una escasa actividad frente a *S. maltophilia*; en todos los casos, los porcentajes de resistencia fueron superiores al 84%, no observándose una variación significativa en los resultados al aumentar el tiempo de lectura a 48 horas. Esta resistencia puede deberse a la producción de enzimas cromosómicas modificantes de aminoglucósidos (principalmente en lo relativo a la resistencia a amikacina y tobramicina) ^(60, 136), a cambios en la membrana externa que determinan resistencia dependiente de temperatura ⁽⁴⁷⁾, o bien a la expresión de sistemas de expulsión activa ⁽⁴⁹⁾. Estos sistemas son bombas de eflujo dependientes de energía que pueden afectar también a la sensibilidad de otros antimicrobianos como las tetraciclinas, quinolonas y cloranfenicol ⁽⁴⁸⁾.

Tal y como cabía esperar, los macrólidos presentaron muy poca actividad *in vitro* frente a *S. maltophilia*, con CMI₉₀ iguales o superiores a 128 mg/l. Esta escasa actividad se debería a la actuación de sistemas de eflujo ⁽⁴⁹⁾, y posiblemente a la actuación de enzimas inactivantes de macrólidos ⁽⁶¹⁾. Por otra parte, se ha empezado a considerar el posible empleo de macrólidos en combinación con otros antimicrobianos ⁽¹³⁷⁾ debido a su efecto *in vivo* antiinflamatorio, y a que han sido relacionados con la inhibición *in vitro* en la producción de los factores de virulencia de *P. aeruginosa*, directamente asociados a la formación de biopelículas en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas.

Otro de los grupos de antimicrobianos cuya sensibilidad está directamente afectada por los sistemas de expulsión activa es el de las tetraciclinas. Dentro de este grupo sólo la tetraciclina presentó una baja actividad frente a *S. maltophilia*, con porcentajes de resistencia a las 24 horas de lectura próximos al 83%; en este caso, destaca el significativo incremento de aislados resistentes al aumentar el tiempo de lectura a 48 horas (97,17%), observándose una marcada reducción en el porcentaje de cepas consideradas inicialmente con sensibilidad intermedia. Tanto doxiciclina como minociclina mostraron una elevada actividad frente a *S. maltophilia*, con porcentajes de resistencia a las 24 horas de lectura de 0% y 3,77%, respectivamente. Como ya ocurriera con tetraciclina, para estos compuestos cabe destacar la variación en el porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia; en ambos casos se observó un importante aumento en dicho porcentaje. Este hecho habría de tenerse en cuenta a la hora de evaluarlos como posible tratamiento, puesto que al aumentar el tiempo de lectura a 48 horas ha sido posible detectar un descenso significativo en el porcentaje de cepas consideradas inicialmente como sensibles, lo cual podría determinar un posible fallo terapéutico; así, Fujita y cols. ⁽¹³⁸⁾ comunicaron, en un estudio de 10 de casos de neumonía por *S. maltophilia*, una respuesta al tratamiento con minociclina del 50%, cuando la sensibilidad *in vitro* de las cepas estudiadas frente a este antimicrobiano era del 100%.

Tigeciclina es una glicilciclina, desarrollada para superar los mecanismos de resistencia que afectan a las tetraciclinas. Los resultados de sensibilidad que hemos obtenido (100% cepas sensibles) concuerdan por los presentados por Insa y cols. ⁽¹³⁹⁾, que proponen a tigeciclina como una prometedora opción terapéutica. De cualquier forma, considerando que doxiciclina, minociclina y tigeciclina son agentes bacteriostáticos, a la hora de valorar el papel de estos compuestos como posible tratamiento hay que considerar su uso en combinación con otros antimicrobianos ^(80, 140), con el fin de evitar posibles fallos terapéuticos.

En cuanto a las quinolonas, estos compuestos han demostrado en varios estudios tener actividad intrínseca frente a *S. maltophilia*; sin embargo, los porcentajes de sensibilidad comunicados en los diferentes estudios son muy variables (72, 80, 127, 141). A la hora de valorar los resultados de sensibilidad de *S. maltophilia* frente a quinolonas en los estudios anteriormente referidos, hay que considerar que la variabilidad en los resultados detectada podría deberse a la diferente metodología empleada y a los criterios utilizados en la evaluación de la sensibilidad en cada trabajo. Sí existe consenso al afirmar que las nuevas fluoroquinolonas presentan mayor actividad *in vitro* que las quinolonas previas (22, 23, 65, 72, 80, 83, 127, 141). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro estudio al evaluar la sensibilidad del microorganismo frente a esta familia de antimicrobianos, observándose los mayores porcentajes de cepas sensibles frente a clinafloxacino, moxifloxacino, trovafloxacino, gatifloxacino y levofloxacino, a ambos tiempos de lectura; la actividad de clinafloxacino resultó ser hasta cuatro diluciones superior que las correspondientes a levofloxacino, moxifloxacino o trovafloxacino, como ya ocurriese en otros trabajos (72, 83, 141). Desafortunadamente, clinafloxacino aún no está comercializado y trovafloxacino fue retirado del mercado europeo como consecuencia de la grave hepatotoxicidad asociada.

Por otra parte, pese a los favorables resultados obtenidos con algunas de las quinolonas testadas, cabe destacar el efecto detectado al aumentar el tiempo de lectura en 24 horas adicionales; al realizar una segunda lectura de resultados a las 48 horas se observó un incremento generalizado en el porcentaje de cepas resistentes que resultó ser estadísticamente significativo para ácido nalidíxico, gemifloxacino y trovafloxacino. Este incremento estaría relacionado con la capacidad de *S. maltophilia*, comunicada por varios autores (22, 143, 144), de desarrollar resistencia durante el tratamiento con quinolonas. La resistencia a este grupo de antimicrobianos se ha relacionado en diversos estudios principalmente con una reducción en la permeabilidad de la membrana, así como con cambios estructurales en la misma que

corresponden a los sistemas de expulsión activa también asociados a la resistencia frente a aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol ^(49, 51). Pese a existir un tercer mecanismo (la modificación enzimática de las subunidades constituyentes de las topoisomerasas II y IV) relacionado con la resistencia a quinolonas, Valdezate y cols. ^(145, 146) han demostrado que en *S. maltophilia*, a diferencia de lo que ocurre en otras especies bacterianas, éste no está implicado en una variación real de la sensibilidad del microorganismo frente a las quinolonas; postulan que la elevada eficacia de las bombas de transporte activo reduce la concentración intracelular de la quinolona hasta unos niveles que no suponen una presión selectiva para las dianas de modificación genética. Esta afirmación estaría fundamentada en el trabajo publicado por Martínez y Baquero ⁽¹⁴⁷⁾, de acuerdo con el cual las mutaciones que reducen la entrada de un antimicrobiano pueden proteger las dianas de mutación en algunas bacterias.

Estudios como el desarrollado por Giamarellos-Bourboulis y cols. ⁽¹⁴²⁾ han demostrado que, si bien las nuevas quinolonas presentan mayor actividad que sus predecesoras, el uso de fluoroquinolonas (en este caso moxifloxacino) puede seleccionar mutantes resistentes. Ba y cols. ⁽¹⁴⁸⁾ confirman esos resultados al presentar la mayor actividad bactericida de moxifloxacino respecto a ciprofloxacino y, por otra parte, verificar la selección de mutantes resistentes a ambas quinolonas durante la simulación farmacocinética-farmacodinámica de los regímenes de dosificación recomendados para estos antimicrobianos. También Garrison y cols. ⁽⁶⁴⁾ corroboran la selección de mutantes resistentes como consecuencia de la exposición a quinolonas; en este caso describieron la selección de mutantes en un modelo farmacodinámico con que evaluaban el tratamiento con ciprofloxacino o levofloxacino. Por todo esto, y pese a los favorables resultados *in vitro* obtenidos con varias de las quinolonas testadas, son necesarios más estudios *in vivo* e *in vitro* para evaluar la verdadera eficacia de estos agentes en el tratamiento frente a *S. maltophilia* solos o en combinación con otros antimicrobianos.

Entre el grupo de los betalactámicos se observó, en general, una actividad bastante limitada, tal y como cabría esperar a tenor de los resultados obtenidos en trabajos anteriores ^(4, 20, 69, 72, 83, 84). La resistencia a los antibióticos betalactámicos está mediada por la producción heterogénea de dos betalactamasas: L1, una metaloenzima capaz de hidrolizar a todos los betalactámicos, excepto a aztreonam, y que es resistente a los inhibidores de betalactamasas, y la L2, una cefalosporinasa de clase A capaz de hidrolizar a aztreonam, y que es sensible a la acción de los inhibidores de betalactamasas, principalmente ácido clavulánico. La expresión de ambas enzimas está determinada por genes cromosómicos que presentan una elevada heterogeneidad ^(55, 58). En menor medida, también participa en la resistencia a betalactámicos la acción de sistemas de transporte activo; a este respecto, Zhang y cols. ⁽⁴⁹⁾ han comunicado que en mutantes de *S. maltophilia* defectivos para betalactamasas continúa existiendo, aunque en menor nivel, resistencia a algunos betalactámicos. Li y cols. ⁽⁵⁰⁾ confirmaron que el sistema SmeABC, equivalente al MexAB-OprM descrito en *P. aeruginosa*, contribuiría a la resistencia frente a estos agentes. En cualquier caso, la resistencia a betalactámicos en estos mutantes parece deberse a una sobreexpresión concomitante de betalactamasas, y no a un aumento en el transporte de antibiótico ⁽⁵⁰⁾. Alonso y Martínez ⁽⁵¹⁾ han indicado la posibilidad de que SmeR (uno de los dos componentes del sistema que activa la expresión del operón *smeABC*), por homología con otros reguladores, active también el gen de la betalactamasa L2.

Por otra parte, destaca el efecto observado al combinar aztreonam, ceftazidima, cefepima, piperacilina y ticarcilina con ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam; en mayor o menor grado la combinación con cualquiera de estos inhibidores de betalactamasas se traduce en la recuperación de la actividad de los betalactámicos con los que se combina. Entre los diferentes inhibidores de betalactamasas, los resultados obtenidos presentan al ácido clavulánico como el inhibidor más activo, obteniéndose valores de CMI hasta dos diluciones inferiores a los valores obtenidos con tazobactam o sulbactam, que a penas restablecieron la eficacia del agente

betalactámico con que fueron combinados. La restauración de la actividad de los betalactámicos al combinarse con inhibidores de betalactamasas, se debe a la inhibición “suicida” (el inhibidor se une a la enzima para bloquearla e impedir que ésta actúe sobre el antimicrobiano) de betalactamasas de tipo L2 ⁽⁵⁵⁾, sensibles a la acción del ácido clavulánico y, en menor grado, a la acción de sulbactam o tazobactam ^(54, 149).

A la vista de los resultados obtenidos, destacarían como posibles opciones “a tener en cuenta”, por presentar la mayor actividad antibacteriana, aztreonam-ácido clavulánico (proporción 2:1), cefepima-ácido clavulánico (2 mg/l) y ticarcilina-ácido clavulánico (2 mg/l), detectándose en todos los casos sinergismo en más del 69% de las cepas estudiadas. Excepto en la combinación con aztreonam, la concentración de ácido clavulánico de 2 mg/l ha determinado los mejores resultados para las asociaciones testadas. En cualquiera de los casos se observa claramente cómo la reducción en la concentración de ácido clavulánico se traduce en una disminución en la eficacia de la combinación. El descenso en la restauración de la actividad del agente betalactámico, aunque evidente, es distinta en función del antimicrobiano con que se combinó el ácido clavulánico. Al reducir la concentración del inhibidor, la concentración de betalactamasas L2 “libres”, y por tanto funcionales, es superior, uniéndose a L1 para anular los betalactámicos en función de la afinidad que presenten por éstos. A este respecto, es necesario indicar que la inactivación de aztreonam por parte de L2 es mayor que la hidrólisis de ticarcilina o cefepima por L1+L2 ^(150, 151); así podemos explicar la razón de las diferencias existentes entre los tres betalactámicos.

En general, la combinación aztreonam-ácido clavulánico (proporción 2:1) presentó los menores porcentajes de aislados resistentes en el perfil de sensibilidad de los cepas que participaron en nuestro estudio (tabla 9; inferiores al 10% a ambos tiempos de lectura); sin embargo, García-Rodríguez y cols. ⁽¹⁵²⁾ han demostrado que, en la combinación aztreonam-ácido clavulánico (proporción 2:1), la concentración de ácido clavulánico desciende más

rápidamente que la de aztreonam, y el sinergismo se pierde rápidamente, lo cual supone una limitación al uso terapéutico de esta asociación. De acuerdo con esto, en nuestro caso la eliminación de esta combinación como posible opción terapéutica se explicaría porque la CMI₉₀ resultante para esta combinación resultó ser 16 mg/l, lo que supondría que la concentración que tendría que alcanzar el ácido clavulánico sería de 8 mg/l, lo cual terapéuticamente es imposible de mantener en el organismo durante un tiempo suficiente para afectar al agente patógeno. Es por esto que la combinación terapéuticamente más real sería aztreonam-ácido clavulánico (2 mg/l), cuyos resultados son peores que los obtenidos con otras combinaciones de ácido clavulánico con ticarcilina o cefepima, por ejemplo.

La evidente recuperación observada en la actividad del antimicrobiano en la combinación ticarcilina-ácido clavulánico (2 mg/l) confirma su uso como terapia alternativa a cotrimoxazol o en combinación con éste, papel plenamente establecido en la actualidad (4, 122, 123) y avalado por diferentes estudios (22, 53, 54, 72, 129). Sin embargo, pese a la experiencia clínica con ticarcilina-ácido clavulánico, existen estudios donde se refieren tasas de resistencia superiores al 40%, como es el caso del trabajo realizado por Nicodemo y cols. ⁽⁶⁵⁾, con un 41% de cepas resistentes, o el 54,7% de resistencia comunicado por Sader y Jones ⁽¹⁵³⁾. En nuestro caso cabe destacar el alto porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia observado a ambos tiempos de lectura, y que es coherente con los resultados obtenidos por Vartivarian y cols. ⁽⁸⁰⁾; este hecho habrá de ser tomado en consideración a fin de evitar posibles fallos terapéuticos.

Por otra parte, la combinación de cefepima con ácido clavulánico (2 mg/l) ha mostrado una interesante actividad *in vitro* frente a *S. maltophilia*. Es especialmente significativo que la combinación de una cefalosporina de cuarta generación, cefepima, con ácido clavulánico no sólo es también efectiva, sino que se ha mostrado más activa que ticarcilina-ácido clavulánico; a la vista de los resultados presentados en la tabla 9, cefepima-ácido clavulánico (2 mg/l) mostró menores porcentajes de resistencia (12,26% y 20,75%, a las 24 y 48 horas respectivamente) que

ticarcilina-ácido clavulánico (2 mg/l) (26,42% y 34,91%, a las 24 y 48 horas respectivamente). Los datos correspondientes a cefepima-ácido clavulánico no hacen sino confirmar los resultados presentados en trabajos anteriores como los realizados por Sevillano y cols. ⁽¹⁵⁴⁾, Cantón y cols. ⁽¹⁵⁵⁾ o Elkhaili y cols. ⁽¹⁵⁶⁾, en los que se estudió la actividad sinérgica de cefepima y ácido clavulánico.

Frente a carbapenemas, tal y como esperábamos, el total de las cepas presentaron resistencia a imipenem (100%). Pese a que meropenem resultó ser más activo, los porcentajes de cepas sensibles a ambos tiempos de lectura fueron inferiores al 4%; por otra parte, en el caso de meropenem los resultados de sensibilidad real a este agente son dudosos dada la fácil y rápida selección de mutantes resistentes cuando son expuestos a los carbapenemas ⁽¹⁵⁷⁾. Howe y cols. ⁽¹⁵⁷⁾ probaron que tanto imipenem como meropenem son inductores de la betalactamasa L1, razón por la cual no son efectivos frente a *S. maltophilia*.

Entre los restantes antimicrobianos testados fosfomicina y rifampicina resultaron ser prácticamente inactivas frente a *S. maltophilia*, lo cual las excluiría como posibles opciones terapéuticas. Esto mismo sucedería con linezolid, pese a no disponer de punto de corte de referencia, los elevados valores de CMI₅₀ obtenidos a ambos tiempos de lectura (>128 mg/l) confirmarían su rechazo como posible alternativa frente a este patógeno. Por su parte, cloranfenicol mostró una cierta actividad frente a *S. maltophilia*; destaca, sin embargo, el altísimo porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia frente a este antimicrobiano (53,77% y 37,74%, a las 24 y 48 horas, respectivamente). Así, los resultados obtenidos a las 48 horas presentan un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el porcentaje de cepas resistentes respecto a la anterior lectura en detrimento, principalmente, de los aislados que inicialmente presentaron sensibilidad intermedia, lo que podría suponer un fallo terapéutico al infravalorar el porcentaje de cepas resistentes. De cualquier forma, la experiencia clínica con cloranfenicol en el tratamiento de infecciones por *S. maltophilia* es muy limitada ⁽²⁰⁾.

Los resultados obtenidos para colistina y polimixina B indican que estos compuestos poseen una baja actividad frente al microorganismo, datos que no concuerdan con los obtenidos por otros grupos como Nicodemo y cols. ⁽⁶⁵⁾ o San Gabriel y cols. ⁽¹⁵⁸⁾, quienes obtuvieron valores de sensibilidad frente a estos compuestos superiores al 75%. De cualquier forma el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ⁽¹⁵⁹⁾ indica que en cualquier caso se debe considerar a colistina y polimixina B como compuestos no activos frente a *S. maltophilia*, lo cual las excluiría como posibles opciones terapéuticas en aquellas colonizaciones/infecciones producidas por este microorganismo.

En la actualidad el cotrimoxazol continúa siendo el principal agente de elección en las infecciones causadas por *S. maltophilia* ^(20, 22, 72, 83, 84, 122, 123, 135, 159), con porcentajes de sensibilidad *in vitro* comunicados superiores al 73,7%. En nuestro estudio, los resultados de sensibilidad a cotrimoxazol fueron inferiores con porcentajes de cepas sensibles de 71,70% y 66,98% a las 24 y 48 horas, respectivamente. Los porcentajes de resistencia a cotrimoxazol han llegado a alcanzar valores significativos, como los comunicados por Micozzi y cols. ⁽¹⁶⁰⁾ (58%) y Valdezate y cols. ⁽⁸³⁾ (27,3%); afortunadamente, la reducción en la prescripción de cotrimoxazol ha permitido que estos valores disminuyan, tal y como evidencian los trabajos de Vartivarian y cols. ⁽⁸⁰⁾ y, en España, Betriu y cols. ⁽⁸⁴⁾. El porcentaje de cepas resistentes mostrado en la presente memoria es superior a los datos presentados en otros trabajos, donde los porcentajes de resistencia oscilan entre 0-26,2% ^(4, 69, 70, 80, 84, 153), pudiendo deberse estas variaciones al empleo de diferentes metodologías y puntos de corte entre los distintos estudios. En nuestro caso, el haber obtenido un mayor porcentaje de resistencia frente a cotrimoxazol (28,30% y 33,02% a las 24 y 48 horas, respectivamente) podría deberse, además, al elevado porcentaje de aislados recogidos de muestras urinarias (29,6%), de forma que la presencia en el tracto urinario de enterobacterias junto a *S. maltophilia* podría suponer la transferencia a esta última de integrones de clase 1 que le confirieran resistencia a sulfametoxazol. Por otra parte, el

tratamiento con cotrimoxazol cuenta con un gran inconveniente: la combinación trimetoprim-sulfametoxazol presenta actividad bacteriostática frente a la mayoría de las cepas; es por esto que se aconseja su uso a la dosis máxima tolerada ⁽⁸⁰⁾, de manera que aumenta la posibilidad de producirse efectos secundarios asociados a los componentes de esta combinación, especialmente en pacientes VIH positivos ^(156, 161-163).

La necesidad de nuevas opciones terapéuticas surge no sólo para disponer de un mayor arsenal con el que enfrentarnos a colonizaciones/infecciones producidas por *S. maltophilia*, sino también para, en la medida de lo posible, mantener dentro de unos márgenes aceptables el nivel de resistencia a cotrimoxazol (limitando su uso) y evitar los efectos secundarios asociados a esta combinación, teniendo en cuenta que *S. maltophilia* a menudo se aísla en pacientes con una enfermedad de base y que, en consecuencia, están severamente debilitados.

Por otra parte, la comparación de los resultados de sensibilidad correspondientes a los pulsotipos únicos (n=106) respecto al total de las cepas recogidas (n= 124), se realizó guiados por el hecho de que en brotes nosocomiales producidos por especies como *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa* se ha detectado una elevada homogeneidad genética entre aislados clínicos cuando se producen brotes, resultado de la transmisión horizontal y/o la persistencia en el medio hospitalario de clones difíciles de eliminar ⁽¹⁶⁴⁾. En nuestro estudio, donde *S. maltophilia* ha mostrado una elevada heterogeneidad genética (confirmada por diferentes trabajos anteriores, ya referidos), al analizar la sensibilidad incluyendo aislamientos pertenecientes a los mismos grupos clonales, es decir aislamientos repetidos (n= 124) (tabla 15), se observó un leve aumento generalizado en el porcentaje de cepas resistentes entre el total de aislados de *S. maltophilia* recogidos respecto a los resultados correspondientes a los pulsotipos únicos. En cualquier caso, estas diferencias sólo tuvieron significado estadístico para algunos antimicrobianos al enfrentar los resultados de sensibilidad obtenidos a las 48 horas, lo cual nos

indica que la caracterización previa mediante PFGE no sería imprescindible para valorar la sensibilidad de *S. maltophilia*.

En la búsqueda de alternativas terapéuticas frente a *S. maltophilia*, valorando los resultados de sensibilidad que hemos obtenido, sólo algunos antimicrobianos han mostrado una potencia o espectro aceptable frente a *S. maltophilia*. Entre el grupo de las quinolonas, los resultados de sensibilidad *in vitro* hacen pensar que las fluoroquinolonas podrían cubrir el hueco dejado por ciprofloxacino, cuyas tasas de resistencia han aumentado significativamente en los últimos años como consecuencia de su uso generalizado desde 1989 (principalmente en pacientes con cáncer) ⁽⁸⁰⁾; sin embargo, la comunicación en diversos trabajos de una elevada selección de mutantes resistentes durante el tratamiento con estos agentes ^(64, 80, 142, 148) los condicionan como posibles opciones terapéuticas y hacen necesario el desarrollo de nuevos estudios *in vitro* e *in vivo* para su evaluación, a fin de evitar posibles fallos terapéuticos.

Los resultados correspondientes a doxiciclina y tigeciclina son muy interesantes; sin embargo, tal y como ya hemos indicado, el hecho de ser agentes bacteriostáticos les supone la misma limitación que a cotrimoxazol, de forma que por mucho que se aumente la concentración de antimicrobiano éste mantendrá una actividad bacteriostática. Además, en el caso de doxiciclina, al igual que sucede con minociclina, ya hemos citado el inconveniente que suponen las variaciones detectadas en el porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia, puesto que el que un aislado tenga sensibilidad intermedia constituye una incertidumbre a lo largo del desarrollo del proceso infeccioso; al incrementar el tiempo aumenta el número de cepas con una menor relación T>CMI, el porcentaje de cepas resistentes es mayor y, con ello, la probabilidad de un posible fallo terapéutico. Por su parte, tigeciclina también es un agente bacteriostático, con los inconvenientes que esto conlleva; pese a esto, los buenos resultados de sensibilidad hacen interesante el desarrollo de nuevos estudios que permitan valorar la acción de este antimicrobiano, así como la evaluación de la experiencia clínica con el mismo.

Finalmente, entre el grupo de los betalactámicos algunas de las combinaciones betalactámico-inhibidor de betalactamasas testadas han ofrecido notables resultados frente a *S. maltophilia*, destacando el hecho de que la combinación de cefepima con ácido clavulánico (2 mg/l) haya, no sólo igualado, sino superado los resultados correspondientes a ticarcilina-ácido clavulánico, reconocida opción terapéutica. Esto supone un respaldo para que cefepima-ácido clavulánico pueda ser considerado un “candidato” a tener en cuenta.

La decisión tomada en su día de profundizar en el estudio de cefepima-ácido clavulánico (2 mg/l) como posible alternativa terapéutica frente a *S. maltophilia* se debió en parte a los buenos resultados obtenidos, coherentes con anteriores trabajos ⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾, pero también a la ventaja que supone (respecto a los restantes grupos de antimicrobianos) el hecho de que los agentes betalactámicos actúen sobre estructuras ausentes en las células eucariotas, lo que les confiere una excelente toxicidad selectiva.

La reducción en la toxicidad a la hora de evaluar una alternativa adecuada para el tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia* es muy importante partiendo de la base de que, como ya hemos comentado, los pacientes afectados por este patógeno son individuos altamente debilitados. En relación con esto, Eliopoulos y Moellering ⁽⁸⁶⁾ ya indicaron la aptitud del uso de combinaciones, en lugar de antimicrobianos de forma aislada, con el fin de proporcionar una cobertura de amplio espectro antimicrobiano en el tratamiento de pacientes que están seriamente enfermos; así mismo, la intención es minimizar la toxicidad, prevenir la emergencia de mutantes resistentes durante la terapia y obtener actividad antibacteriana sinérgica. Todo esto sustenta la propuesta inicial de cefepima-ácido clavulánico (2 mg/l) como posible opción en el tratamiento de colonizaciones/infecciones producidas por *S. maltophilia* puesto que, a parte de que la toxicidad asociada a la combinación es menor que la correspondiente a cotrimoxazol, cefepima tiene escasa afinidad por las betalactamasas cromosómicas y plasmídicas, difunde a través de la pared bacteriana con mayor rapidez que otros betalactámicos, presenta una escasa

tendencia a la selección de mutantes resistentes y posee un amplio espectro antibacteriano que abarca tanto a bacterias gramnegativas como grampositivas (mejora la actividad de las cefalosporinas de tercera generación) ⁽¹⁶⁵⁾. Actuando cefepima y ácido clavulánico de forma sinérgica, la inhibición de L2 por parte del segundo, unido a la reducida afinidad de cefepima por L1, haría posible que el antimicrobiano actuase sobre el/los patógenos, en caso de tratarse de una infección polimicrobiana.

De cualquier forma, es necesario profundizar en el estudio de la combinación sinérgica cefepima-ácido clavulánico a fin de comprobar su papel real como posible opción terapéutica en el tratamiento de colonizaciones/infecciones producidas por *S. maltophilia*.

De los diferentes métodos para valorar el efecto sinérgico entre los componentes de una combinación, las curvas de muerte bacteriana permiten no sólo obtener datos inhibitorios, sino que también hacen posible conocer si llega a alcanzarse actividad bactericida ⁽¹³⁴⁾. Tanto para cefepima, como para cefepima-ácido clavulánico y ticarcilina-ácido clavulánico, la representación gráfica de la actividad bacteriana respecto al tiempo nos permitió observar los posibles recrecimientos del microorganismo, en caso de haberlos, durante las pautas más usuales de administración de antibiótico y, con ello, estimar la posibilidad de desarrollo de resistencias.

A la vista de los resultados presentados en la figura 8 y la tabla 17, es posible comprobar que entre las 8 y 24 horas de exposición, en contraposición con los resultados correspondientes a la combinación cefepima-ácido clavulánico (2mg/l), los recrecimientos bacterianos por encima del inóculo inicial fueron evidentes para la mayoría de las cepas frente a cefepima y ticarcilina-ácido clavulánico (2 mg/l), siendo especialmente acusados para las concentraciones 50% $C_{m\acute{a}x}$ y 25% $C_{m\acute{a}x}$. En el caso de cefepima, se observó que a medida que disminuía la concentración de antimicrobiano los recrecimientos anteriormente referidos se hacían más pronunciados, detectándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) en 7 de las 12 cepas. Frente a cefepima destaca la acentuada reducción presentada por la cepa 120; en este caso, pese a

haber obtenido una CMI de 32 mg/l, el comportamiento difiere del presentado por otras cepas con CMI 32 (asilados 1 y 88). El hecho de que su comportamiento sea más parecido al presentado por la cepa 22, con CMI= 16 mg/l, hace pensar que la CMI real del aislado 120 sea inferior a 32 mg/l, y que el haber obtenido un valor final superior podría deberse a que en la población bacteriana de esta cepa pueda haber subpoblaciones con menor sensibilidad a cefepima cuyo crecimiento determine la lectura a una mayor concentración (posibilidad posteriormente confirmada mediante el análisis del perfil poblacional realizado tras la simulación con el sistema farmacodinámico).

Los resultados previos de sensibilidad obtenidos fueron coherentes con diferentes estudios, basados en pruebas de sensibilidad *in vitro*, que presentan la combinación ticarcilina-ácido clavulánico como uno de los agentes más activos ^(53, 54, 80, 82). Sin embargo, en nuestro caso, al valorar la actividad de ticarcilina-ácido clavulánico frente a los aislados seleccionados se obtuvieron resultados similares a cefepima, detectándose mayor actividad de ticarcilina-ácido clavulánico frente a los aislados 23, 62, 80 y 88 (siendo estas diferencias estadísticamente significativas para las cepas 62 y 88). Pese a observarse recrecimientos entre las horas 8 y 24 de exposición para el 75% de las cepas, el recuento final de UFC/ml superó el inóculo inicial para alguna de las concentraciones testadas en el 58,3% de los aislados. En general, tras 24 horas de exposición a esta combinación, salvo en aquellos casos en los que se produjo una clara reducción respecto al inóculo inicial, el recuento bacteriano se mantuvo muy próximo al inóculo inicial, superando a éste a medida que se reducía la concentración de ticarcilina. La inhibición inicial observada, seguida de un recrecimiento bacteriano, frente a ticarcilina-ácido clavulánico es un fenómeno ya descrito en los trabajos desarrollados por Garrison y cols. ⁽⁶⁴⁾, y Poulos y cols. ⁽⁸²⁾. Estos recrecimientos serían de suma importancia a la hora de establecer una terapia, puesto que la moderada actividad observada incluso con cepas consideradas inicialmente sensibles (como es el caso de los aislados 23 y 62) puede suponer la posibilidad de fallo terapéutico.

En cuanto a la combinación de cefepima con ácido clavulánico a una concentración fija de 2mg/l, la valoración de la actividad de esta asociación ha confirmado los buenos resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad; de hecho, esta combinación ha demostrado ser, además de potente, sinérgica a concentraciones terapéuticas de ambos agentes.

Al igual que para cefepima y ticarcilina-ácido clavulánico, el incremento de la relación $C_{m\acute{a}x}/CMI$ se tradujo para todas las cepas en un aumento en la muerte bacteriana de forma dosis-dependiente. Con independencia de la sensibilidad de los aislamientos, la adición del inhibidor de betalactamasas restauró la actividad de cefepima frente a todas las cepas estudiadas; este incremento en la actividad respecto a cefepima sola presentó significación estadística en 10 de las 12 cepas analizadas.

Los datos presentados en la tabla 17 confirman el sinergismo entre ácido clavulánico y cefepima, tal y como podríamos esperar en base a los resultados de cefepima y cefepima-ácido clavulánico previamente obtenidos en las pruebas de sensibilidad. Mediante curvas de letalidad, la valiosa potencia de la combinación se hizo evidente de forma inversa al incremento de la actividad asociado al aumento de la concentración de cefepima, observándose el máximo efecto sinérgico a la concentración mínima ensayada (25% $C_{m\acute{a}x}$): 9/12 aislados, frente a los 5/12 correspondientes a la máxima concentración ($C_{m\acute{a}x}$). Así, los resultados obtenidos con las concentraciones más bajas revelan el efecto del inhibidor de betalactamasas sobre L2, de tal manera que la reducción de la actividad antibacteriana observada al disminuir la concentración de $C_{m\acute{a}x}$ a 25% $C_{m\acute{a}x}$ es menos acusada para la combinación cefepima-ácido clavulánico que para cefepima sola: al anular la enzima, la misma concentración de antimicrobiano puede llegar a triplicar la actividad observada en ausencia de inhibidor de betalactamasas.

Al comparar la actividad antibacteriana desarrollada por cefepima-ácido clavulánico respecto a la correspondiente a ticarcilina-ácido clavulánico, pudimos comprobar su superioridad frente a todos los aislados, a cualquiera de las concentraciones testadas; esto es de suma

importancia considerando la diversidad de CMLs de las cepas seleccionadas. Es también muy interesante que para el 83,3% de los aislados la reducción de la concentración de cefepima en la combinación no haya presentado significación estadística; de hecho, aunque para la cepa 41 si se haya encontrado significación estadística, al reducir la concentración de cefepima en la combinación la actividad de C/C 50% y C/C 25% es superior a la desarrollada por cualquiera de las concentraciones de ticarcilina-ácido clavulánico (con $p < 0,01$ respecto a T/C75%, T/C 50% y T/C 25%).

Por otra parte, con el fin de valorar la idoneidad de cefepima-ácido clavulánico como posible nueva opción también quisimos compararla con otras alternativas propuestas como, por ejemplo, la combinación de un agente betalactámico con una quinolona ^(87, 166).

Los resultados obtenidos para la combinación de cefepima y gatifloxacino mostraron un efecto sinérgico al combinar ambos compuestos, confirmando los datos descritos en trabajos realizados por Gradelski y cols. ⁽⁸⁷⁾ y Dawis y cols. ⁽¹⁶⁶⁾, hasta alcanzar una actividad antibacteriana muy interesante. Adicionalmente, al comparar la actividad de esta combinación con los resultados correspondientes a ticarcilina-ácido clavulánico observamos una mayor actividad para cefepima-gatifloxacino que para la segunda combinación, lo cual apoyaría la propuesta de cefepima-gatifloxacino como posible opción a tener en cuenta. Por otra parte, para comparar la actividad de esta misma combinación con la desarrollada por cefepima-ácido clavulánico elegimos las menores concentraciones de cefepima-ácido clavulánico puesto que la actividad desarrollada por éstas es la más aproximada a la alcanzada por la combinación cefepima-gatifloxacino. Tal y como muestran la tabla 19 y la figura 9, la actividad comparativa de cefepima-gatifloxacino respecto a cefepima-ácido clavulánico resultó ser superior. Sin embargo, teniendo en cuenta consideraciones farmacocinéticas, las concentraciones de cefepima-gatifloxacino que han resultado sinérgicas y han mostrado mayor actividad son complicadas de mantener (e incluso alcanzar) tras la administración de dosis habituales de ambos

antimicrobianos (CFP, 2000 mg IV cada 8 h, $C_{\text{máx}}$ =163,9 mg/l; y GAT 400 mg cada 24 h, $C_{\text{máx}}$ = 4 mg/l), lo que podría derivar en el desarrollo y/o selección de resistencias. Por todo esto, cabe la posibilidad de que el desarrollo de resistencias a quinolonas sea el responsable del fallo de un importante número de asociaciones que engloban a estos agentes. En cualquier caso, la actividad desarrollada por mayores concentraciones de cefepima-ácido clavulánico resultó significativamente superior a la desarrollada por cualquiera de las concentraciones de cefepima-gatifloxacino ensayadas.

El haber obtenido, confirmando los resultados de sensibilidad, resultados superiores a una opción terapéutica establecida como es ticarcilina-ácido clavulánico y que mejoran la actividad de otras combinaciones propuestas (betalactámico-quinolona), hacen que cefepima-ácido clavulánico deje de ser una simple propuesta ⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾ y se convierta en una opción terapéutica a tener en cuenta.

A lo largo de la presente memoria hemos expuesto las razones por las que se han hecho necesarias nuevas alternativas para combatir a *Stenotrophomonas maltophilia*. A parte de lo ya indicado, es interesante remarcar la urgencia de esta necesidad especialmente desde la publicación del trabajo realizado por Anderson y cols. ⁽¹⁶⁷⁾ donde se demuestra la existencia, al igual que en otros patógenos como *S. aureus*, *P. aeruginosa* o *E. coli*, de las denominadas “variantes de colonias pequeñas” (VCP) en individuos con fibrosis quística. Anderson y cols. presentan la posibilidad de que en estos pacientes las cepas salvajes de *S. maltophilia* sean colonizadores transitorios, mientras que las VCP persisten en las vías respiratorias. *S. maltophilia* está habitualmente asociada a colonizaciones/infecciones en pacientes con fibrosis quística, quienes reciben frecuentes ciclos de antibióticos, de forma que la adaptación del patógeno al medio en las vías respiratorias de estos individuos es muy similar a la presión antibiótica que determina la generación de VCP. En relación con esto, un punto muy importante de esta comunicación radica en el hecho de que hayan conseguido aislar VCP tras una

prolongada exposición a cotrimoxazol, lo que dificulta aún más si cabe el tratamiento de pacientes con fibrosis quística que presentan una colonización/infección por *S. maltophilia*.

Las actuales líneas de investigación comprenden, por ejemplo, el estudio de la base molecular de los factores de virulencia. Así, el trabajo publicado por Fouhy y cols.⁽¹⁶⁸⁾ indica que las señales célula-célula participan en la regulación de varias funciones que contribuyen a la resistencia a los antibióticos, así como en los factores de virulencia de *S. maltophilia*. La interrupción de estas señales podría ser una aproximación a un potencial tratamiento, sin embargo existe un inconveniente al ser posible que el papel de las señales célula-célula sea diferente en función de la cepa bacteriana.

Con el trabajo expuesto en la presente memoria nuestra participación en la necesaria búsqueda de nuevas opciones terapéuticas frente a *S. maltophilia* pasa por valorar combinaciones de compuestos sobradamente conocidos. En nuestro caso la valoración de nuevas opciones terapéuticas no se limita a las clásicas pruebas de sensibilidad o curvas de muerte bacteriana a concentraciones fijas de antimicrobiano, sino que empleamos un sistema farmacodinámico *in vitro* que permite reproducir la farmacocinética del antimicrobiano de acuerdo a las pautas de eliminación observadas en humanos. Como ya demostraran Ba y cols.⁽¹⁴⁸⁾, Garrison y cols.⁽⁶⁴⁾, Mueller y cols.⁽⁹⁹⁾ y Zelenitsky y cols.⁽¹³⁵⁾, entre otros, con la aplicación de modelos/sistemas de simulación farmacodinámica se supera ampliamente la valoración de la actividad que pueden ofrecernos las alternativas habituales a las pruebas clásicas de sensibilidad. Con estos ensayos podemos modificar las concentraciones de antimicrobiano, adaptándolas a las que se van alcanzando en el lugar de la infección a lo largo del tiempo, y con ello aproximar al máximo las condiciones de estudio al medio *in vivo*. De hecho, su aplicación sobre microorganismos que, por su resistencia innata o adquirida, suponen un problema de amplio impacto social es vital, más si cabe cuando la baja prevalencia de este tipo de microorganismos impide el normal desarrollo de ensayos clínicos en humanos. Frente a los

estudios desarrollados en modelos animales, quizás la ausencia de sistema inmune (variable que no es posible de simular en el sistema *in vitro*) pueda suponer un inconveniente; sin embargo, al estudiar una posible alternativa terapéutica frente a colonizaciones/infecciones producidas por *S. maltophilia* hay que tener en cuenta que se trata de pacientes altamente debilitados, con una inmunosupresión severa.

La actividad desarrollada por ceftazidima y cefepima frente a las cuatro cepas estudiadas (resistentes a ambos antimicrobianos) fue reducida, con escasos descensos en el recuento de microorganismos viables a lo largo del periodo de administración (especialmente en los aislados 80 frente a ceftazidima y 43 a cefepima, para los que la población resistente pareció más homogénea) y fuertes recrecimientos que superaron el inóculo inicial (salvo en el caso del aislado 120 frente a cefepima en infusión continua) al final del periodo de evaluación. En el caso de cefepima destaca el diferente comportamiento observado en función del tipo de administración (considerando que, en ausencia de inhibidor, la cinética calculada para la administración intermitente de cefepima determina los siguientes %T>CMI: 34,37%, 16,75% y 10%, para las CMIs 32 mg/l, 64 mg/l y 128mg/l, respectivamente; la infusión continua no llega a superar la CMI, aunque sí se mantiene constante). Concluidas las 24 horas de simulación, el recuento final de viables correspondiente a cefepima en su administración intermitente fue superior que el observado para la administración en infusión continua de este mismo antimicrobiano, detectándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre ambas administraciones frente a los aislados 88 y 120; la diferente actividad detectada frente a ambos aislados, considerando que su CMI es 32 mg/l, podría estar relacionada con la diferente proporción de subpoblaciones situadas a concentraciones próximas a la C_{ss} , tal y como se ha demostrado frente a *P. aeruginosa* ^(169, 170). Con la administración intermitente (IV) de cefepima ($C_{m\acute{a}x}$ 163 mg/l) se observó una rápida reducción del recuento de microorganismos viables (aproximadamente 2 log₁₀ UFC/ml) dentro de las cuatro primeras horas de simulación

(posiblemente por eliminación de células correspondientes a las subpoblaciones más sensibles), seguida de marcados recrementos bacterianos (correspondientes a la multiplicación de las subpoblaciones más resistentes cuya CMI no ha sido superada por la concentración de cefepima el tiempo suficiente para erradicarla en su totalidad) . Con la infusión continua (IC, C_{ss} 20 mg/l) la reducción de la población al inicio del tratamiento fue muy suave, y en consecuencia los recrementos bacterianos poco marcados o inexistentes; la “sutileza” en este comportamiento se debería a una compensación entre la muerte bacteriana de las subpoblaciones más sensibles y la multiplicación celular de las subpoblaciones resistentes.

Al valorar la actividad del tratamiento con ticarcilina-ácido clavulánico se observó un comportamiento similar al presentado por ceftazidima y cefepima frente a los aislados 43, 80 y 88, considerados resistentes a la combinación, con rápidos recrementos precedidos por un descenso en el recuento de viables en los aislados 43 y 80 y una total ausencia de actividad en el aislado 88 (más homogéneo en su resistencia inicial a la combinación); el aislado 120, por el contrario, tras 24 horas de exposición presentó un recuento de viables inferior al inóculo inicial. Aunque los resultados obtenidos en nuestro estudio (tanto en curvas de muerte bacteriana a concentraciones fijas de ticarcilina-ácido clavulánico, como las realizadas con el sistema farmacodinámico) hayan presentado recuentos finales de viables que superaron el inóculo inicial, la pauta de recrementos tras una inhibición inicial coincide con la descrita por Garrison y cols.⁽⁶⁴⁾, de forma que la moderada actividad detectada es coherente con los resultados obtenidos por Neu y cols.⁽¹⁷¹⁾, quienes evaluaron la actividad de ticarcilina en combinación con concentraciones de ácido clavulánico basadas en consideraciones farmacocinéticas.

En cualquier caso, como ya indicamos con anterioridad, al hacer una valoración comparativa de la actividad desarrollada por diferentes betalactámicos hay que considerar cómo los agentes analizados se ven afectados por los mecanismos de resistencia que *S. maltophilia* posee para combatirlos. En este sentido y teniendo en cuenta la revisión realizada por Bush y

Sykes ⁽¹⁷²⁾ sobre metodología para el estudiar la relación estructura-actividad y el mecanismo de acción de las betalactamasas, las diferencias presentadas a lo largo de la presente memoria entre la combinación propuesta de cefepima-ácido clavulánico, y ticarcilina-ácido clavulánico, como opción terapéutica actualmente en uso. Estas diferencias obedecerían al heterogéneo comportamiento cinético de L1 y L2: respecto a ceftazidima, cefepima presenta una menor afinidad por las betalactamasas y una mayor resistencia a la hidrólisis (además de una mayor penetración a través de la membrana celular) ⁽¹⁷³⁾; respecto a ticarcilina, cefepima presenta también menor afinidad y eficiencia de hidrólisis por las betalactamasas ^(150, 151, 174). Por otra parte, también habría que considerar la diferente afinidad que presentan las proteínas plasmáticas por cefepima y ticarcilina, que va a determinar su biodisponibilidad *in vivo*; a este respecto, en la bibliografía disponible podemos comprobar cómo se ha descrito un índice de unión a proteínas para cefepima de entre 16-20% ^(120, 122, 175, 176), mientras que para ticarcilina se ha descrito entre 35-65% ^(120, 177, 178).

Para evaluar la combinación cefepima-ácido clavulánico de acuerdo a las formulaciones disponibles en la actualidad, hay que considerar que por inconvenientes comerciales (las moléculas son comercializadas por distintas empresas farmacéuticas) la combinación con cefepima debe incorporar necesariamente a amoxicilina, de forma que también valoramos el posible efecto antagónico que implicaría la presencia de este último. La incorporación de amoxicilina-ácido clavulánico al régimen intermitente o en infusión continua de cefepima potenció la actividad de ambos tratamientos, confirmando de tal forma el sinergismo entre cefepima y ácido clavulánico observado previamente al valorar la actividad de la combinación mediante curvas de muerte bacteriana a concentraciones fijas de ambos compuestos. En ningún caso se observó efecto antagónico al agregar amoxicilina a la combinación de cefepima y ácido clavulánico.

De todos los regímenes analizados, la coadministración intermitente de cefepima IV con amoxicilina-ácido clavulánico cada 8 horas demostró la mayor actividad anti- *S. maltophilia*, produciendo una reducción $\geq 99,9\%$ del inóculo inicial en las primeras 12 horas de tratamiento frente a todos los aislados. Dado que la elevada eficacia de esta combinación se observó con independencia del nivel de resistencia presentado a cefepima (los aislados presentaron un intervalo de resistencias desde 32 hasta los 128 mg/l) o ticarcilina-ácido clavulánico o cotrimoxazol, cepas de *S. maltophilia* con una CMI ≤ 16 mg/l a la combinación cefepima-ácido clavulánico (o lo que es lo mismo, cepas con un nivel de resistencia de hasta 128 mg/l a cefepima), deberían ser consideradas sensibles.

Por otra parte, la coadministración de cefepima en infusión continua más amoxicilina-ácido clavulánico *in bolus* mostró una actividad antibacteriana que, aunque interesante, resultó significativamente menor que la presentada por la combinación administrada de forma intermitente; el efecto bactericida observado tras 12 horas de tratamiento para 3 de los aislados sólo se mantuvo a la hora 24 para la cepa 88, produciéndose recrecimientos bacterianos incluso en los aislados más sensibles a cefepima. Esta pérdida de actividad de la combinación respecto a la desarrollada por la administración intermitente podría deberse a los diferentes niveles máximos alcanzados por los regímenes simulados, puesto que, tal y como observamos anteriormente mediante curvas de muerte bacteriana convencionales (ver tabla 17), la eficacia del sinergismo cefepima-ácido clavulánico (expresado en forma de reducción del inóculo inicial tras 24 horas de exposición) aumentaba de forma proporcional al incremento de la concentración de cefepima en la combinación con el inhibidor de betalactamasas a una concentración fija de 2 mg/l.

Del mismo modo, de acuerdo con los resultados presentados en la tabla 27, los valores de CMI a cefepima y cefepima-ácido clavulánico (principalmente los correspondientes a la combinación) de todos los derivados del tratamiento cefepima+amoxicilina-ácido clavulánico en

infusión continua mostraron aumentos de hasta 3 diluciones respecto a los valores de CMI que estos mismos aislados presentaban antes de iniciar el tratamiento *in vitro*. En cambio, tras la exposición a cefepima+amoxicilina-ácido clavulánico administración intermitente sólo se apreciaron aumentos a cefepima en la cepa 80 (una única dilución), mientras que la sensibilidad frente a cefepima-ácido clavulánico de los aislados post-tratamiento no mostraba aumentos significativos y, además, revelaba incluso descensos.

Los cambios observados en la CMI justifican que los recrecimientos observados son, aunque parezcan muy leves, consecuencia directa de la selección de subpoblaciones resistentes durante el tratamiento (a falta de datos que confirmen lo contrario, son producto de la selección de subpoblaciones un alto grado de resistencia a cefepima). Incluso en estos casos, aunque también se produzca un incremento en los valores de CMI a cefepima-ácido clavulánico, el sinergismo con ácido clavulánico es evidente, descartando la selección de subpoblaciones con alteraciones en la betalactamasa L2 (sensible a la acción del ácido clavulánico) que impidan su unión. Es probable que este efecto ya pueda observarse, aunque limitado a la escasa actividad intrínseca de cefepima, entre las administraciones de cefepima de forma intermitente e infusión continua sin combinar con amoxicilina-ácido clavulánico. De cualquier forma, indicar que no estimamos que estas subpoblaciones resistentes sean la denominadas “variantes de colonias pequeñas” (VCP) referidas con anterioridad al citar el trabajo realizado por Anderson y cols. ⁽¹⁶⁷⁾; las subpoblaciones observadas en nuestro estudio presentan diferentes características respecto a VCP: crecen sin problema en agar sangre y su tiempo de crecimiento es sólo ligeramente más lento que el de las cepas salvajes, lo que dista mucho de las exigencias nutricionales de las VCP y su elevadísimo tiempo de crecimiento (mínimo 48 horas).

Por otra parte, la existencia de subpoblaciones con diferente sensibilidad se hizo evidente, de la misma forma que en el trabajo desarrollado por MacGowan y cols. ⁽¹⁷⁹⁾ con *Pseudomonas aeruginosa*, por la alta dispersión de concentraciones en las que se observó

crecimiento bacteriano al realizar el PAP (entre 0,125xCMI y 16xCMI, en algunos casos), reflejo de una alta heterogeneidad entre las UFCs de una misma cepa. Este hecho ha de ser tenido en cuenta a la hora de valorar el tiempo real que la concentración de cefepima se mantiene sobre la CMI, considerando la existencia de subpoblaciones con diferente CMI que puedan necesitar concentraciones superiores a la CMI determinada en el estudio de sensibilidad para inhibir su multiplicación (concentraciones $\text{peri-CMI} > \text{CMI}$) y cuyo crecimiento no sea evidente por encontrarse por debajo del límite de detección del propio método empleado.

Es por esto que en nuestro caso, en el que hay una elevada heterogeneidad celular, pese que a que el mejor parámetro que refleja la actividad antibacteriana es el $T > \text{CMI}$, también va a ser determinante cuántas veces esté la concentración de cefepima por encima de la CMI; de esta forma, sería necesario alcanzar una relación $C_{\text{máx}}/\text{CMI}$ que permitiera acabar con esas bacterias con $\text{peri-CMI} > \text{CMI}$ (como ya indicasen Mueller y cols. ⁽⁹⁹⁾, aunque el efecto de los betalactámicos-entre otros- depende del tiempo que el antibiótico esté en contacto con la bacteria, su actividad aumentará al incrementar su concentración hasta alcanzar un valor concreto en que se produce la máxima muerte bacteriana). Es decir, es recomendable alcanzar picos elevados de cefepima durante la administración, que aumenten el intervalo de subpoblaciones sensibles a la combinación y en consecuencia reduzcan de forma eficaz la selección de altos niveles de resistencia. En función de estos resultados, los aislados de *S. maltophilia* con valores de CMI de hasta 128 mg/l a cefepima, serían tratados satisfactoriamente con administraciones de cefepima IV 2000 mg + amoxicilina-ácido clavulánico 1000/2000 mg combinadas.

Finalmente, resaltar el hecho de que los resultados obtenidos al valorar la actividad de los distintos tratamientos estudiados confirman la importancia de los sistemas *in vitro* respecto a los métodos clásicos (determinación del perfil de sensibilidad, curvas de muerte bacteriana a concentraciones fijas de antimicrobiano). En los nuevos métodos, al aplicar la cinética del

antimicrobiano, la fluctuación de las concentraciones del compuesto respecto al tiempo a lo largo del periodo de dosificación proporciona una aproximación más real a la actividad *in vivo* del antibiótico en estudio.

CONCLUSIONES

Tomando como referencia los objetivos marcados y una vez analizados los resultados de los experimentos que se han ido presentando a lo largo de la presente memoria, las conclusiones que podemos extraer son las siguientes:

- 1.- La caracterización genotípica mediante PFGE de los aislados recogidos en nuestro estudio permitió constatar el alto poder discriminatorio de esta técnica, así como la elevada heterogeneidad genética de *S. maltophilia* ya referida en numerosos estudios. De esta forma se confirma el papel de la PFGE en la identificación de posibles transmisiones en un brote, con el fin de identificar el origen del mismo.
- 2.- *S. maltophilia* presenta, en general, un alto grado de resistencia a los principales grupos de antimicrobianos, considerándose un microorganismo multirresistente. Destacan los valores de sensibilidad frente a las nuevas quinolonas, tetraciclinas, cotrimoxazol y la asociación betalactámicos-inhibidor de betalactamasas.
- 3.- Los inhibidores de betalactamasas restablecen la actividad de los antimicrobianos betalactámicos. El ácido clavulánico es el inhibidor de betalactamasas más activo frente a *S. maltophilia*, ya que determina una reducción del porcentaje de cepas resistentes muy superior a la conseguida por sulbactam o tazobactam en combinación con los mismos agentes betalactámicos.
- 4.- Las variaciones detectadas en los porcentajes de aislados resistentes a los diferentes antimicrobianos ensayados a las 24 y 48 horas de lectura de resultados, confirman que aún estamos lejos de encontrar una metodología que nos permita determinar con fiabilidad la sensibilidad de *S. maltophilia*.

- 5.- Los fallos terapéuticos detectados durante el uso clínico de ticarcilina-ácido clavulánico estarían relacionados con los fuertes recrecimientos observados a cualquiera de las concentraciones testadas de la combinación, incluso frente a aislados considerados inicialmente sensibles a ticarcilina-ácido clavulánico.
- 6.- La combinación de quinolonas y cefalosporinas es una alternativa menos eficaz que la simple combinación de dos betalactámicos; posiblemente el desarrollo de resistencias a quinolonas sea el responsable del fallo terapéutico de un importante número de asociaciones que engloban a estos agentes.
- 7.- La combinación cefepima+amoxicilina-ácido clavulánico demuestra, a dosis terapéuticas, una excelente actividad frente a *S. maltophilia* con independencia de su resistencia a ticarcilina-ácido clavulánico y/o cotrimoxazol (actuales tratamientos de elección). La combinación de cefepima con amoxicilina-ácido clavulánico sería una excelente alternativa a los tratamientos convencionales recomendados frente a este patógeno.
- 8.- La capacidad bactericida de la combinación sobre cepas con valores de $\text{CMI}_{(\text{CFP}+\text{A/C})}$ 8-16 mg/l (ó $\text{CMI}_{(\text{CFP})}$ 32-128 mg/l) debería ser, por lo menos *in vitro*, suficiente para el tratamiento de más del 90% de las cepas de esta especie.
- 9.- Los sistemas *in vitro* son una herramienta de útil aplicación para la búsqueda de alternativas al tratamiento de patógenos cuya escasa prevalencia en el medio dificultan el desarrollo de ensayos clínicos y son una excelente alternativa a la experimentación animal: aportan resultados similares y permiten predecir la eficacia y el desarrollo de resistencias durante el tratamiento antibiótico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. Int J Syst Bacteriol. 1993; 43:606-609.
2. Hugh R, Ryschenkow E. *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. J Gen Microbiol. 1961; 26:123-132.
3. Swings J, de Vos P, Vvan der Mooter M, de Ley J. Transfer os *Pseudomonas maltophilia* to the genus *Xanthomonas maltophilia* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1983; 33:409-413.
4. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:57-80.
5. Drancourt M, Bollet C, Raoult D. *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. Int J Syst Bacteriol. 1997; 47:160-163.
6. Coenye T, Vanlaere E, Falsen E, Vandamme P. *Stenotrophomonas africana* Drancourt et al. 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993. Int J Syst Evol Microbiol. 2004; 54:1235-1237.
7. Finkmann, W., Altendorf, K., Stackebrandt, E. & Lipski, A. Characterisation of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2000; 50:273–282.
8. Assih EA, Ouattara AS, Thierry S, Cayol JL, Labat M, Macarie H. *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52: 559–568.
9. Wolf A, Fritze A, Hagemann M, Berg G. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52: 1937–1944.

10. Yoon SH, Kang SJ, Oh HW, Oh TK. *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56:1363-1367.
11. Fenton JJ, Harsch HH, Klein D. Production of volatile nitrogenous compounds from the degradation of streptomycin by *Pseudomonas maltophilia*. J. Bacteriol 1973; 116:1267-1272.
12. Mai P, Jacobsen OS, Aamand J. Mineralization and co-metabolic degradation of phenoxyalkanoic acid herbicides by a pure bacterial cultura isolated from an aquifer. Appl Microbiol Biotechnol 2001; 56:486-490.
13. Nawaz MS, Franklin W, Cerniglia CE. Degradation of acrylamide by immobilized cells of a *Pseudomonas* sp. and *Xanthomonas maltophilia*. Can J Microbiol 1993; 39: 207-212.
14. Villarino ME, Stevens LE, Schable B, Mayers G, Miller JM, Burke JP, Jarvis WR. Risk factors for epidemic *Xanthomonas maltophilia* infection/colonization in intensive care unit patients. Infect Control Hosp Epidemiol 1992; 13:201-206.
15. Gardner P, Griffin WB, Swartz MN, Kunz LJ. Nonfermentative gram-negative bacilli of nosocomial interest. Am J Med 1970; 48:735-749.
16. Bottone EJ, Reitano M, Janda JM, Troy K, Cuttner J. *Pseudomonas maltophilia* exoenzyme activity as correlate in pathogenesis of ecthyma gangrenosum. J Clin Microbiol. 1986; 24:995-997.
17. Jucker BA, Harms H, Zehnder AJ. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. Bacteriol 1996; 178:5472-5479.
18. Mooney L, Kerr KG, Denton M. Survival of *Stenotrophomonas maltophilia* following exposure to concentrations of tobramycin used in aerosolized therapy for cystic fibrosis patients. Int J Antimicrob Agents. 2001; 17:63-66.

19. Senol E. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. J Hosp Infect. 2004; 57:1-7.
20. Nicodemo AC, Paez JI. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007; 26:229-237.
21. De Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Alcantara N, Martinez MB, Giron JA. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. Cell Microbiol. 2003; 5:625-636.
22. Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). Clin Infect Dis. 2001; 32:S104-S113.
23. Sevillano D, Valdezate S, Gomez-Lus ML. An update of the susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia*. Rev Esp Quimioter. 2001; 14:138-154.
24. Crispino M, Boccia MC, Bagattini M, Villari P, Triassi M, Zarrilli R. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* in a university hospital. J Hosp. Infect. 2002; 52: 88-92.
25. Valdezate S, Vindel A, Martin-Davila P, Del Saz BS, Baquero F, Canton R. High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. J Clin Microbiol. 2004; 42:693-699.
26. Berg G, Roskot N, Smalla K. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Clin Microbiol. 1999; 37:3594-3600.

-
27. Julve R, Rovira E, Belda A, Prat J, Escoms R, Albert A, Gonzalvo F. Manifestaciones clínicas de la infección por *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. An Med Interna. 1998; 15:476-480.
 28. Heath T, Currie B. Nosocomial and community-acquired *Xanthomonas maltophilia* infection in tropical Australia. J Hosp Infect. 1995; 30:309-313.
 29. Denton M, Todd NJ, Kerr KG, Hawkey PM, Littlewood JM. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. J Clin Microbiol. 1998; 36:1953-1958.
 30. Khardori N, Elting L, Wong E, Schable B, Bodey GP. Nosocomial infections due to *Xanthomonas maltophilia (Pseudomonas maltophilia)* in patients with cancer. Rev Infect Dis. 1990; 12:997-1003.
 31. Del Toro MD, Rodriguez-Bano J, Martinez-Martinez L, Pascual A, Perez-Canoa R, Perea EJ, Muniain MA. Epidemiology, clinical features and prognosis of infections due to *Stenotrophomonas maltophilia*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006; 24:4-9.
 32. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Annual Data Report 2002. Bethesda, Maryland: Cystic Fibrosis Foundation, 2003.
 33. Steinkamp G, Wiedemann B, Rietschel E, Kahl A, Gielen J, Barmeier H, Ratjen F; Emerging Bacteria Study Group. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2005; 4:41-48.
 34. Goss CH, Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Rubenfeld GD, Ramsey BW. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. Thorax. 2004; 59:955-959.
 35. Goss CH, Otto K, Aitken ML, Rubenfeld GD. Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166:356-361.

-
36. Talmaciu I, Varlotta L, Mortensen J, Schidlow DV. Risk factors for emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2000; 30:10-15.
 37. Demko CA, Stern RC, Doershuk CF. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: incidence and prevalence. *Pediatr Pulmonol*. 1998; 25:304-308.
 38. Krcmery V, Trupl J, Svetlansky I. Susceptibility to antimicrobial agents of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients with cancer and bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:1656.
 39. Muder RR, Yu VL, Dummer JS, Vinson C, Lumish RM. Infections caused by *Pseudomonas maltophilia*. Expanding clinical spectrum. *Arch Intern Med*. 1987; 147: 1672-1674.
 40. Senol E, DesJardin J, Stara PC, Barefoot L, Snyderman DR. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2002; 34:1653-1656.
 41. Jang TN, Wang FD, Wang LS, Liu CY, Liu IM. *Xanthomonas maltophilia* bacteremia: an analysis of 32 cases. *J Formos Med Assoc*. 1992; 91:1170-1176.
 42. Siebor E, Llanes C, Lafon I, Ogier-Desserrey A, Duez JM, Pechinot A, Caillot D, Grandjean M, Sixt N, Neuwirth C. Presumed pseudobacteremia outbreak resulting from contamination of proportional disinfectant dispenser. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; 26: 195-198.
 43. Vartivarian SE, Papadakis KA, Palacios JA, Manning JT Jr, Anaissie EJ. Mucocutaneous and soft tissue infections caused by *Xanthomonas maltophilia*. A new spectrum. *Ann Intern Med*. 1994; 121:969-973.
 44. Penland RL, Wilhelmus KR. *Stenotrophomonas maltophilia* ocular infections. *Arch Ophthalmol*. 1996; 114:433-436.

-
45. Bottone EJ, Madayag RM, Qureshi MN. Acanthamoeba keratitis: synergy between amebic and bacterial cocontaminants in contact lens care systems as a prelude to infection. J Clin Microbiol. 1992; 30:2447-2450.
 46. McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. Am J Infect Control. 2006; 34:S29-S37.
 47. Rahmati-Bahram A, Magee JT, Jackson SK. Growth temperature-dependent variation of cell envelope lipids and antibiotic susceptibility in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 1995; 36:317-326.
 48. Alonso A, Martinez JL. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41:1140-1142.
 49. Zhang L, Li XZ, Poole K. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:287-293.
 50. Li XZ, Zhang L, Poole K. SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:333-343.
 51. Alonso A, Martinez JL. Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:3079-3086.
 52. Zhang L, Li XZ, Poole K. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:3497-3503.
 53. Pankuch GA, Jacobs MR, Rittenhouse SF, Appelbaum PC. Susceptibilities of 123 strains of *Xanthomonas maltophilia* to eight beta-lactams (including beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations) and ciprofloxacin tested by five methods. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38:2317-2322.

-
54. Lecso-Bornet M, Bergogne-Berezin E. Susceptibility of 100 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* to three beta-lactams and five beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations. J Antimicrob Chemother. 1997; 40:717-720.
 55. Avison MB, Higgins CS, von Heldreich CJ, Bennett PM, Walsh TR. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:413-419.
 56. Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. Biochim Biophys Acta. 1994; 1218:199-201.
 57. Sanschagrin F, Dufresne J, Levesque RC. Molecular heterogeneity of the L-1 metallo-beta-lactamase family from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42:1245-1248.
 58. Avison MB, Higgins CS, Ford PJ, von Heldreich CJ, Walsh TR, Bennett PM. Differential regulation of L1 and L2 beta-lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 2002; 49:387-389.
 59. Avison MB, von Heldreich CJ, Higgins CS, Bennett PM, Walsh TR. A TEM-2beta-lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 2000; 46:879-884.
 60. Lambert T, Ploy MC, Denis F y Courvalin P. Characterization of the chromosomal aac(6')-Iz gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43:2366-2371.
 61. Alonso A, Sanchez P, Martinez JL. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:1778-1782.

-
62. Barbolla R, Catalano M, Orman BE, Famiglietti A, Vay C, Smayevsky J, Centrón D, Piñeiro SA. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:666-669.
 63. Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13:559-565.
 64. Garrison MW, Anderson DE, Campbell DM, Carroll KC, Malone CL, Anderson JD, Hollis RJ, Pfaller MA. *Stenotrophomonas maltophilia*: emergence of multidrug-resistant strains during therapy and in an in vitro pharmacodynamic chamber model. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40:2859-2864.
 65. Nicodemo AC, Araujo MR, Ruiz AS, Gales AC. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53:604-608.
 66. Bonfiglio G, Livermore DM. Effect of media composition on the susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1991; 28:837-842.
 67. Carroll KC, Cohen S, Nelson R, Campbell DM, Claridge JD, Garrison MW, Kramp J, Malone C, Hoffmann M, Anderson DE. Comparison of various in vitro susceptibility methods for testing *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 32:229-235.
 68. Liaw SJ, Teng LJ, Hsueh PR, Ho SW, Luh KT. In vitro activities of antimicrobial combinations against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Formos Med Assoc*. 2002; 101:495-501.

-
69. Arpi M, Victor MA, Mortensen I, Gottschau A, Bruun B. In vitro susceptibility of 124 *Xanthomonas maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*) isolates: comparison of the agar dilution method with the E-test and two agar diffusion methods. APMIS. 1996; 104:108-114.
 70. Traub WH, Leonhard B, Bauer D. Antibiotic susceptibility of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*: comparative (NCCLS criteria) evaluation of antimicrobial drugs with the agar dilution and the agar disk diffusion (Bauer-Kirby) tests. Chemotherapy. 1998; 44:164-173.
 71. Bal AM, Gould IM. Empirical antimicrobial treatment for chemotherapy-induced febrile neutropenia. Int J Antimicrob Agents. 2007; 29:501-509.
 72. Schmitz FJ, Sadurski R, Verhoef J, Milatovic D, Fluit AC. Typing of 154 clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* by pulsed-field gel electrophoresis and determination of the in vitro susceptibilities of these strains to 28 antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2000; 45:921-923.
 73. Schable B, Rhoden DL, Jarvis WR, Miller JM. Prevalence of serotypes of *Xanthomonas maltophilia* from world-wide sources. Epidemiol Infect. 1992; 108:337-341.
 74. Stull TL, LiPuma JJ, Edlind TD. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis. 1988; 157:280-286.
 75. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Gel Electrophoresis of DNA. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. En: Chris Nolan (ed.). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989; 6.50-6.62.
 76. Klausner JD, Zukerman C, Limaye AP, Corey L. Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteremia Among Patients Undergoing Bone Marrow transplantation: Association With Faulty Replacement of Handwashing Soap". Infect Control Hosp Epidemiol. 1999; 20:756-758.

-
77. Talon D, Bailly P, Leprat R, Godard C, Deconnink E, Cahn JY, Michel-briand Y. Typing of hospital strains of *Xanthomonas maltophilia* by pulsed-field gel electrophoresis. J Hosp Infect. 1994; 27:209-217.
 78. Denton M, Keer V, Hawkey PM. Correlation between genotype and beta-lactamases of clinical and environmental strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 1999; 43:555-558.
 79. Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004; 25:847-851.
 80. Vartivarian S, Anaissie E, Bodey G, Sprigg H, Rolston K. A changing pattern of susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to antimicrobial agents: implications for therapy. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38:624-627.
 81. Korzets A, Ori Y, Rudnicki C, Chagnac A, Weinstein T, Herman M, Kevin D, Gafter U. *Xanthomonas maltophilia*--a growing problem in the haemodialysis population. Nephrol Dial Transplant. 1997; 12:2174-2176.
 82. Poulos CD, Matsumura SO, Willey BM, Low DE, McGeer A. In vitro activities of antimicrobial combinations against *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39:2220-2223.
 83. Valdezate S, Vindel A, Loza E, Baquero F, Canton R. Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:1581-1584.
 84. Betriu C, Sanchez A, Palau ML, Gomez M, Picazo JJ. Antibiotic resistance surveillance of *Stenotrophomonas maltophilia*, 1993-1999. J Antimicrob Chemother. 2001; 48:152-154.
 85. Munoz Bellido JL, Munoz Criado S, Garcia Garcia I, Alonso Manzanares MA, Gutierrez Zufiaurre MN, Garcia-Rodriguez JA. In vitro activities of beta-lactam-beta-

-
- lactamase inhibitor combinations against *Stenotrophomonas maltophilia*: correlation between methods for testing inhibitory activity, time-kill curves, and bactericidal activity. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41:2612-2615.
86. Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. Antimicrobial combinations. En: Lorian V (ed.). Antibiotics in laboratory medicine (4th Ed.). Williams & Wilkins, Baltimore. 1996; 330-396.
87. Gradelski E, Valera L, Bonner D, Fung-Tomc J. Synergistic activities of gatifloxacin in combination with other antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* and related species. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:3220-3222.
88. Muder RR, Harris AP, Muller S, Edmond M, Chow JW, Papadakis K, Wagener MW, Bodey GP, Steckelberg JM. Bacteremia due to *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*: a prospective, multicenter study of 91 episodes. Clin Infect Dis. 1996; 22:508-512.
89. Ball P, Baquero F, Cars O, File T, Garau J, Klugman K, Low DE, Rubinstein E, Wise R; Consensus Group on Resistance and Prescribing in Respiratory Tract Infection. Antibiotic therapy of community respiratory tract infections: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. J Antimicrob Chemother. 2002; 49:31-40.
90. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis. 1998; 26:1-10; quiz 11-2.
91. MacGowan A, Bowker K. Developments in PK/PD: optimising efficacy and prevention of resistance. A critical review of PK/PD in in vitro models. Int J Antimicrob Agents. 2002; 19:291-298.
92. Vinks AA. The application of population pharmacokinetic modeling to individualized antibiotic therapy. Int J Antimicrob Agents. 2002; 19:313-322.
93. Cruz M. Fundamentos de terapéutica pediátrica. En: Cruz M (ed.). Tratado de pediatría. Espaxs, S.A, Barcelona. 1994; 51-70.

-
94. Craig WA. Pharmacodynamics of antimicrobials: general concepts and applications. En: Nightingale CH, Murakawa T, Ambrose PG (eds.). Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice. Marcel Dekker, Inc, New York. 2002; 1-22.
 95. Soriano F. Farmacodinamia: factor predictivo de eficacia. An Esp Pediatr. 2002; 56:25-30.
 96. Danish M. Clinical pharmacokinetics. En: Yaffe SJ, Aranda JV (eds.). Pediatric pharmacology: therapeutic principles in practice. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1992; 22-28.
 97. Amsden GW, Ballow CH, Bertino JS. Farmacocinética y farmacodinámica de los agentes antiinfecciosos. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds.). Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica (5ª Ed.). Editorial Médica Panamericana S.A., Madrid. 2002; 312-321.
 98. Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. J Antimicrob Chemother. 2005; 55:601-607.
 99. Mueller M, de la Peña A, Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:369-377.
 100. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 33:2233-2239.
 101. Hunter, PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988; 26: 2465-2466.
 102. Millemann Y, Lesage MC, Chaslus-Dancla E, Lafont JP. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. J Clin Microbiol. 1995; 33: 173-179.

-
103. Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76: 5269-5273.
104. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. 2007. Document M100-S17, Vol. 27, No. 1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
105. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard-seventh edition. 2006. Document M7-A17, Vol. 26, No. 2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
106. Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos. Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioterap*. 2000; 13:73–86.
107. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline.1999. Vol 19, no. 18. Document M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, Pa.
108. Giamarellos-Bourboulis EJ, Karnesis L, Giamarellou H. Synergy of colistin with rifampin and trimethoprim/sulfamethoxazole on multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 44:259-263.
109. Jones RN. Disk diffusion susceptibility test development for the new glycyclcycline. GAR-936, *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999; 35:249–252.
110. Maxipime®, información del producto:
www.medsafe.govt.nz/profs/Datasheet/m/Maxipimeinj.htm.
111. Timentin®, información del producto:
http://us.gsk.com/products/assets/us_timentin_iv.pdf.

-
112. Lober S, Ziege S, Rau M, Schreiber G, Mignot A, Koeppe P, Lode H. Pharmacokinetics of gatifloxacin and interaction with an antacid containing aluminum and magnesium. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:1067-1071.
 113. Blaser J, Stone BB, Zinner SH. Efficacy of intermittent versus continuous administration of netilmicin in a two-compartment *in vitro* model. *Antimicrob Agent Chemother.* 1985; 27: 343-349.1, 2.
 114. Blaser J. *In vitro* model for simultaneous simulation of the serum kinetics of two drugs with different half-lives, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1985; 15suplA, 125-130.
 115. Fortaz®, información del producto: http://us.gsk.com/products/assets/us_fortaz.pdf.
 116. Augmentin®, información del producto: www.medsafe.govt.nz/profs/Datasheet/a/Augmentininj.htm.
 117. Burgess DS, Hastings RW, Hardin TC. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefepime administered by intermittent and continuous infusion. *Clin Ther.* 2000; 22:66-75.
 118. Andrews JM. Microbiological assays. En: Reeves BS, Wise R, Andrews JM, White LO (eds.). *Clinical antimicrobial assays*. Oxford University Press, New York. 1999; 35–44.
 119. Andrews JM, White LO. Quality assurance. En: Reeves BS, Wise R, Andrews JM, White LO (eds.). *Clinical antimicrobial assays*. Oxford University Press, New York. 1999; 77–92.
 120. White LO, Andrews JM. β -Lactams. En: Reeves BS, Wise R, Andrews JM, White LO (eds.). *Clinical antimicrobial assays*. Oxford University Press, New York. 1999; 93–122.
 121. Goudah A, Mounair SM, Shim JH, Abd El-Aty AM. Influence of endotoxin induced fever on the pharmacokinetics of intramuscularly administered cefepime in rabbits. *J Vet Sci.* 2006; 7:151-155.
 122. Sande M, Eliopoulos G, Moellering R, Gilbert D. *Guía Sanford de Tratamiento Antimicrobiano* 2006. 36th ed. Sperryville, Antimicrobial Therapy inc, 2006.

-
123. Mensa J, Gatell JM, Azanza JR, Domínguez-Gil A, García JE, Jiménez de Anta MT, Prats G. Guía de Terapéutica Antimicrobiana 2005. 15° ed. Barcelona, Masson, 2005.
 124. Elting LS, Khardori N, Bodey GP, Fainstein V. Nosocomial infection caused by *Xanthomonas maltophilia*: a case-control study of predisposing factors. Infect Control Hosp Epidemiol. 1990; 11:134-138.
 125. Hauben L, Vauterin L, Moore ER, Hoste B, Swings J. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. Int J Syst Bacteriol. 1999; 4:1749-1760.
 126. García de Viedma D, Marín M, Cercenado E, Alonso R, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Evidence of nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* cross-infection in a neonatology unit analyzed by three molecular typing methods. Infect Control Hosp Epidemiol. 1999; 20:816-820.
 127. Laing FP, Ramotar K, Read RR, Alfieri N, Kureishi A, Henderson EA, Louie TJ. Molecular epidemiology of *Xanthomonas maltophilia* colonization and infection in the hospital environment. J Clin Microbiol. 1995; 33:513-518.
 128. Ribera A, Domenech-Sanchez A, Ruiz J, Benedi VJ, Jimenez de Anta MT, Vila J. Mutations in gyrA and parC QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiological unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. Microb Drug Resist. 2002; 8:245-251.
 129. Calza L, Manfredi R, Chiodo F. *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* as an emerging opportunistic pathogen in association with HIV infection: a 10-year surveillance study. Infection. 2003; 31:155-161.
 130. Levendoglu F, Ugurlu H, Ozerbil OM, Tuncer I, Ural O. Urethral cultures in patients with spinal cord injury. Spinal Cord. 2004; 42:106-109.
 131. Levy SB. The antibiotic paradox: How Miracle drugs are destroying the miracle. New York; NY and London, England: Plenum Press; 1992.

-
132. García-Rodríguez JA, Fresnadillo MJ. El futuro de los antimicrobianos. Nuevos enfoques terapéuticos. En: García-Rodríguez JA (ed.). Antimicrobianos en Medicina (2ª Ed.). Prous Science SA, Barcelona. 2006; 783-798.
 133. Paterson DL. "Collateral damage" from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy. Clin Infect Dis. 2004; 38:S341- S345.
 134. Johnson CC. In vitro testing: correlations of bacterial susceptibility, body fluid levels, and effectiveness of antibacterial therapy. En: Lorian V (ed.). Antibiotics in laboratory medicine (4th Ed.). Williams & Wilkins, Baltimore. 1996; 813-834.
 135. Zelenitsky SA, Iacovides H, Ariano RE, Harding GK. Antibiotic combinations significantly more active than monotherapy in an in vitro infection model of *Stenotrophomonas maltophilia*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 51:39-43.
 136. Okazaki A, Avison MB. Aph (3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51:359-360.
 137. Saiman L, Chen Y, Gabriel PS, Knirsch C. Synergistic activities of macrolide antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:1105-1107.
 138. Fujita J, Yamadori I, Xu G, Hojo S, Negayama K, Miyawaki H, Yamaji Y, Takahara J. Clinical features of *Stenotrophomonas maltophilia* pneumonia in immunocompromised patients. Respir Med. 1996; 90:35-38.
 139. Insa R, Cercenado E, Goyanes MJ, Morente A, Bouza E. In vitro activity of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 2007; 59:583-585.

-
140. Vouillamoz J, Moreillon P, Giddey M, Entenza JM. In vitro activities of tigecycline combined with other antimicrobials against multiresistant gram-positive and gram-negative pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61:371-374.
 141. Weiss K, Restieri C, De Carolis E, Laverdière M, Guay H. Comparative activity of new quinolones against 326 clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45:363-365.
 142. Giamarellos-Bourboulis EJ, Karnesis L, Galani I, Giamarellou H. In vitro killing effect of moxifloxacin on clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3997-3999.
 143. Cheng AF, Li MKW, Ling TKW, French GL. Emergence of ofloxacin-resistant *Citrobacter freundii* and *Pseudomonas maltophilia* after ofloxacin therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 1987; 20:283-285.
 144. Lecso-Bonet M, Pierre J, Sarkis-Karam D. Susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to six quinolones and study of outer membrane proteins in resistant mutants selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36: 669–671.
 145. Valdezate S, Vindel A, Echeita A, Baquero F, Canto R. Topoisomerase II and IV quinolone resistance-determining regions in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates with different levels of quinolone susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:665-671.
 146. Valdezate S, Vindel A, Saéz-Nieto JA, Baquero F, Cantón R. Preservation of topoisomerase genetic sequences during in vivo and in vitro development of high-level resistance to ciprofloxacin in isogenic *Stenotrophomonas maltophilia* strains. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56:220-223.
 147. Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:1771-1777.

-
148. Ba BB, Feghali H, Arpin C, Saux MC, Quentin C. Activities of ciprofloxacin and moxifloxacin against *Stenotrophomonas maltophilia* and emergence of resistant mutants in an in vitro pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:946-953.
 149. Pradhananga SL, Rowling PJ, Simpson IN, Payne DJ. Sensitivity of L-2 type beta-lactamases from *Stenotrophomonas maltophilia* to serine active site beta-lactamase inhibitors. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 37:394-396.
 150. Felici A, Amicosante G. Kinetic analysis of extension of substrate specificity with *Xanthomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*, and *Bacillus cereus* metallo-beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39:192-199.
 151. Saino Y, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of an inducible cephalosporinase from *Pseudomonas maltophilia* GN12873. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984; 25:362-365.
 152. Garcia-Rodriguez JA, Garcia Sanchez JE, Munoz Bellido JL, Garcia Garcia MI, Garcia Sanchez E. Kinetics of antimicrobial activity of aztreonam/clavulanic acid (2:1) against *Xanthomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 1991; 27:552-554.
 153. Sader HS, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25:95-109.
 154. Sevillano D, Valero E, García R, Calvo A, Alou L, Gómez-Lus ML. Actividad sinérgica de cefepima-ácido clavulánico frente a aislamientos clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia*. *Rev Esp Quimioterap* 2001; 14(Supl.1):190.
 155. Cantón R, Valdezate S, Sánchez del Sanz B y cols. Cefepime and betalactamase inhibitor combinations against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Infect* 1998; 5(Supl.3):379.

-
156. Elkhaili H, Pompei D, Linger L, Kamili N, Monteil H, Jehl F. Kinetics of bactericidal activity of cefepime and ceftazidime alone or combined with gentamicin, amikacin or ciprofloxacin against *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Enterobacter cloacae* hyperproductive in cephalosporinase. *Pathol Biol (Paris)*. 1996; 44:367-373.
 157. Howe RA, Wilson MP, Walsh TR, Millar MR. Susceptibility testing of *Stenotrophomonas maltophilia* to carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 1997; 40:13-17.
 158. San Gabriel P, Zhou J, Tabibi S, Chen Y, Trauzzi M, Saiman L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:168-171.
 159. EUCAST: http://www.escmid.org/Files/EUCAST_Expert_rules_draft_2_for_comment.pdf
 160. Micozzi A, Venditti M, Monaco M, Friedrich A, Taglietti F, Santilli S, Martino P. Bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis*. 2000; 31: 705-711.
 161. Gómez García AC, Blanco Roca MT, Morásn Domínguez FJ, Pérez Giraldo C, Hurtado Manzano C, Fernández Calderón MC. Nitroimidazoles, sulfamidas, diaminopirimidinas y asociaciones. En: García-Rodríguez JA (ed.). *Antimicrobianos en Medicina* (2ª Ed.). Prous Science SA, Barcelona. 2006; 301-308.
 162. Floris-Moore MA, Amodio-Groton MI, Catalano MT. Adverse reactions to trimethoprim/sulfamethoxazole in AIDS. *Ann Pharmacother*. 2003; 37:1810-1813.
 163. Kocak Z, Hatipoglu CA, Ertem G, Kinikli S, Tufan A, Irmak H, Demiroz AP. Trimethoprim-sulfamethoxazole induced rash and fatal hematologic disorders. *J Infect*. 2006; 52:49-52.
 164. Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J, Flores C, Brooks S. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and

-
- Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. Arch Intern Med. 2002; 162:1515-1520.
165. García Vazquez E, Mensa J. Espectro antibacteriano de cefepima. Emergencias. 2001; 13:S51-S56.
166. Dawis MA, Isenberg HD, France KA, Jenkins SG. In vitro activity of gatifloxacin alone and in combination with cefepime, meropenem, piperacillin and gentamicin against multidrug-resistant organisms. J Antimicrob Chemother. 2003; 51:1203-1211.
167. Anderson SW, Stapp JR, Burns JL, Qin X. Characterization of small-colony-variant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis. 2007; 45:529-535.
168. Fouhy Y, Scanlon K, Schouest K, Spillane C, Crossman L, Avison MB, Ryan RP, Maxwell Dow J. Diffusible signal factor-dependent cell-cell signalling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. 2007; 189:4964-4068.
169. Alou L, Aguilar L, Sevillano D, Gimenez MJ, Echeverria O, Gomez-Lus ML, Prieto J. Is there a pharmacodynamic need for the use of continuous versus intermittent infusion with ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*? An in vitro pharmacodynamic model. J Antimicrob Chemother. 2005; 55:209-213.
170. Mouton JW, Vinks AA. Is continuous infusion of beta-lactam antibiotics worthwhile?-- efficacy and pharmacokinetic considerations. J Antimicrob Chemother. 1996; 38:5-15.
171. Neu HC, Saha G, Chin NX. Resistance of *Xanthomonas maltophilia* to antibiotics and the effect of beta-lactamase inhibitors. Diagn Microbiol Infect Dis. 1989; 12:283-285.
172. Bush K, Sykes RB. Methodology for the study of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1986; 30:6-10.

-
173. Fung-Tomc J, Dougherty TJ, DeOrio FJ, Simich-Jacobson V, Kessler RE. Activity of cefepime against ceftazidime- and cefotaxime-resistant gram-negative bacteria and its relationship to beta-lactamase levels. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33:498-502.
 174. Crowder MW, Walsh TR, Banovic L, Pettit M, Spencer J. Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:921-926.
 175. Barbhaiya RH, Forgue ST, Shyu WC, Papp EA, Pittman KA. High-pressure liquid chromatographic analysis of BMV-28142 in plasma and urine. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31:55-59.
 176. Gerding DN, Hughes CE, Bamberger DM, Foxworth J, Larson TA. Extravascular antimicrobial distribution and the respective blood concentrations in humans. En: Lorian V (ed.). *Antibiotics in laboratory medicine* (4th Ed.). Williams & Wilkins, Baltimore. 1996; 835-899.
 177. Woodnutt G, Kernutt I, Mizen L. Pharmacokinetics and distribution of ticarcillin-clavulanic acid (Timentin) in experimental animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31:1826-1830.
 178. Perl TM, Pfaller MA, Houston A, Wenzel RP. Effect of serum on the in vitro activities of 11 broad-spectrum antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34:2234-2239.
 179. MacGowan AP, Rogers CA, Holt HA, Bowker KE. Activities of moxifloxacin against, and emergence of resistance in, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:1088-1095.
 180. Hanes SD, Demirkan K, Tolley E, Boucher BA, Croce MA, Wood GC, Fabian TC. Risk factors for late-onset nosocomial pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in critically ill trauma patients. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 228-235.